ENTWICKLUNGSGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN PHYSARUM POLYCEPHALUM: PROBLEME BEI DER SELEKTION VON ENZYM-MUTANTEN BEI MYXAMÖBEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt
von

ANNEGRET HAARS
aus Goslar

Göttingen 1976

ENTWICKLUNGSGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN PHYSARUM POLYCEPHALUM: PROBLEME BEI DER SELEKTION VON ENZYM-MUTANTEN BEI MYXAMÖBEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt
von
ANNEGRET HAARS
aus Goslar

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7
Referent: Prof. Dr. A. Hüttermann
Korreferent: Prof. Dr. H. Lorenzen
Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1976

Diese Arbeit wurde am Forstbotanischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von April 1974 bis Juni 1976 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Hüttermann möchte ich für die Vergabe des Themas und die mir stets gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Dr. W. Eschrich.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. C.H.R. McCullough für die zahlreichen Amöben-Stammkulturen, sowie für die vielen hilfreichen Ratschläge zur Ausarbeitung der Medien, besonders während meines Aufenthaltes in Leicester.

Herrn Dipl.-Geologen H. Scholz danke ich für die Raster-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen, Herrn Dr. J.H. Nuske für Hilfestellung bei der Transmissions-Elektronenmikroskopie.

Herrn Prof. Dr. H. Lorenzen möchte ich für seine stete Anteilnahme an der Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Forstbotanischen Instituts für vielseitige Anleitung, Unterstützung und anregende Diskussionen.

Die Arbeit wurde durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Prof. Dr. A. Hüttermann unterstützt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Verwendeter Organismus	6
2.2.	Kulturbedingungen	6
2.2.1.	Anzucht auf Agar mit Futterbakterien	6
2.2.2.	Anzucht im axenischen Flüssigkeitsmedium	8
2.2.3.	Induktion der Zystenbildung	13
2.3.	Herstellung der Enzymextrakte	13
2.4.	Bestimmung der Enzymaktivitäten	14
2.4.1.	Aminopeptidase	14
2.4.2.	Phosphodiesterase	16
2.4.3.	Ribonuclease	16
2.4.4.	Protease	17
2.5.	Screening auf Enzymmangelmutanten mit histochemischen Enzymtests	18
2.5.1.	Test auf RNase$^{(-)}$- und DNase$^{(-)}$-Mutanten	18
2.5.2.	Tests auf Phosphatase$^{(-)}$-Mutanten	19
2.5.3.	Test auf Alaninaminopeptidase$^{(-)}$-Mutanten	19
2.6.	Präparative isoelektrische Fokussierung im Saccharose-Dichtegradienten	23
2.7.	Bestimmung der Substratspezifität der RNase- und Aminopeptidase-Isoenzyme durch Hochspannungselektrophorese	25
2.7.1.	Trennung von Aminosäuren und Dipeptiden	25
2.7.2.	Trennung von Mono- und Dinucleotiden	27

Seite

2.8. Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie während der Enzystierung 29
2.8.1. Fixierung von Amöben und Zysten für die Rasterelektronenmikroskopie 29
2.8.2. Fixierung von Amöben und Zysten für die Transmissionselektronenmikroskopie 30
2.9. Chemikalien 30
3. Ergebnisse 32
3.1. Screening auf Enzymmangelmutanten 32
3.1.1. Anreicherung von Enzymmangelmutanten mit der "BUdR-Suicide"-Methode 32
3.1.2. Test auf RNase$^{(-)}$-Mutanten 33
3.1.3. Test auf DNase$^{(-)}$-Mutanten 34
3.1.4. Test auf Phosphatase$^{(-)}$-Mutanten 34
3.1.5. Test auf Alaninaminopeptidase$^{(-)}$-Mutanten 35
3.2. Ausarbeitung eines axenischen Flüssigkeitsmediums 37
3.3. Biochemische Charakterisierung der Aminopeptidasen, RNasen und Proteasen in axenisch wachsenden Amöben 39
3.3.1. Isoenzymmuster und Substratspezifität der Aminopeptidasen 39
3.3.2. Isoenzymmuster und Substratspezifität der RNasen 48
3.3.3. Isoenzymmuster der intra- und extrazellularen Proteasen 53
3.4. Strukturelle und ultrastrukturelle Veränderungen während der Differenzierung 55
3.4.1. Induktion der Zystenbildung 56

Seite

3.4.1. Ultrastrukturelle Veränderungen während der Enzystierung 62

3.5. Isoenzymmuster der Aminopeptidasen, RNasen und Proteasen während der Differenzierung 74

4. Diskussion 77

4.1. Zur Zysteninduktion 77

4.2. Zur Charakterisierung der Aminopeptidasen 78

4.3. Zur Charakterisierung der Proteasen 82

4.4. Zur Charakterisierung der RNasen 83

4.5. Vergleich des haploiden und diploiden Entwicklungsstadiums im Hinblick auf eine mögliche differentielle Genaktivität 88

5. Zusammenfassung 90

6. Literaturverzeichnis 92

1. EINLEITUNG

Der Myxomycet Physarum polycephalum ist ein geeigneter Modellorganismus für biochemische und genetische Untersuchungen von Kontrollmechanismen des Wachstums und der Differenzierung bei Eukaryonten (Übersichtsarbeiten siehe Hüttermann, 1973, und Dee, 1975).
Was ihn für diese und andere biologische Fragestellungen besonders interessant macht, ist sein komplexer Entwicklungszyklus, bei dem Wachstum und Differenzierung als scharf getrennte Phasen auftreten (Gray und Alexopoulos, 1968).

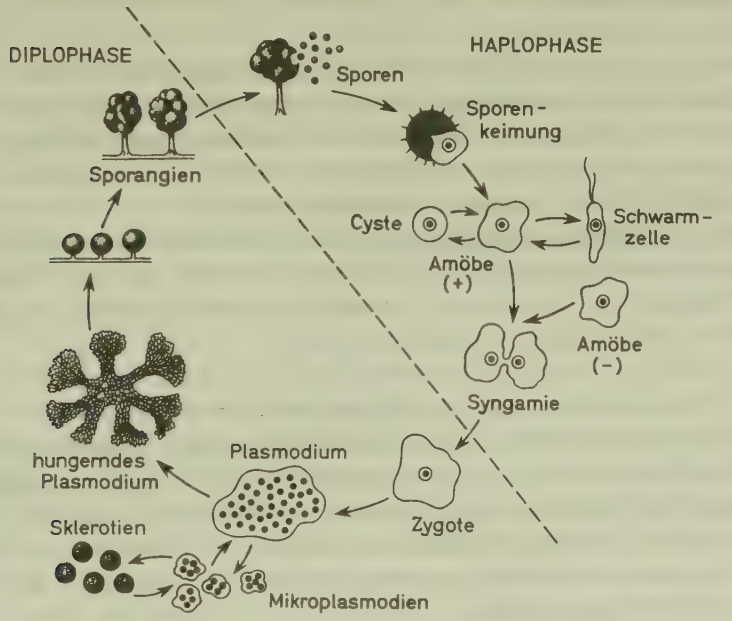


Abb. 1: Schematische Darstellung der einzelnen Stadien im Generationszyklus von Physarum polycephalum (E. Freiberg aus Hüttermann, 1973)

Wie alle anderen Myxomyceten zeigt auch Physarum polycephalum einen Generationswechsel zwischen einem vielkernigen diploiden Plasmodium und den einkernigen haploiden Amöben.
Das Plasmodium stellt eine zellwand-freie Riesenzelle mit bis zu 10^8 diploiden Kernen dar, die sich in natürlicher Synchronie etwa alle 8 Stunden teilen (Guttes und Guttes, 1964).
Wegen dieser synchronen Kernteilungen ist der Organismus ein besonders geeignetes Objekt für Untersuchungen des Zellzyklus, insbesondere für die Induktion und Steuerung der Kernteilung (Übersichtsarbeiten siehe Schiebel, 1973, und Jokusch, 1975).

Das Fehlen einer Zellwand ermöglicht es dem Pilz a) sich induziert durch Nahrungsmangel, Licht, Feuchtigkeit oder Chemotaxis über weite Strecken fortzubewegen und b) falls er dabei auf ein anderes Plasmodium von gleichem Fusionstyp trifft, mit diesem zu verschmelzen.
Somit ist Physarum polycephalum auch als Modellorganismus für photobiologische Studien (Rakoczy, 1973) und für Untersuchungen über Fusion und Inkompatibilität von somatischen Zellen interessant (Carlile, 1973).

Bei Nahrungsmangel und Einwirkung von Licht bildet das Plasmodium Sporangien. Die daraus entlassenen Sporen keimen zu haploiden Amöben aus. Da dieser Vorgang von einer normalen Meiose mit Chromosomensegregation begleitet ist, kann der Organismus genetisch bearbeitet werden. Die Methoden zur Mutanteninduktion wurden von Haugli (1971) und Haugli und Dove (1972) entwickelt.

Bei dem heterothallischen Stamm "Wisconsin" führt nur die Verschmelzung zweier Amöben von verschiedenem Kreuzungstyp zur diploiden Zygote. Der homothallische bzw. apogame "Colonia"-Stamm zeigt dagegen ein flexibles Paarungsver-

halten der Amöben. Hier können sich die Plasmodien aus einem Amöbenklon ohne Änderung der Chromosomenzahl entwickeln (Apogamie, vgl. Jockusch, 1975). Außerdem ist durch eine Kernfusion zweier Amöben eines Klones die Bildung einer Zygote möglich (Homothallie, Wheals, 1970).
Die auf eine dieser beiden Weisen entstandenen Plasmodien haben also ein mit den Mutteramöben identisches Genom und sind somit für genetische Untersuchungen besonders vorteilhaft.

Ausgehend von den beiden vegetativen Formen, Plasmodium und Amöbe, gibt es noch Differenzierungsformen, die nicht von einem Kernphasenwechsel begleitet sind: Sklerotienbildung (Spherulenbildung) von Plasmodien und analog dazu Enzystierung von Amöben. Diese beiden Stadien stellen Dauerformen dar, die es dem Organismus erlauben, auch langandauernde ungünstige Umweltbedingungen zu überleben.
Die Bildung von Sklerotien kann unter definierten Bedingungen induziert werden: einmal durch Hunger im nährstoff-freien Salzmedium (Daniel und Baldwin, 1964) und zum anderen durch Induktion mit Mannit, das dem Wachstumsmedium zugesetzt wird (Chet und Rusch, 1969).

Plasmodien von Physarum werden schon seit Jahren in axenischer Kultur gezüchtet (Daniel und Baldwin, 1964). Die Amöben konnten dagegen bis vor kurzem nur auf Agar mit einem Bakterienrasen (e.g. E.coli) als Futter kultiviert werden (Haugli, 1971). Daher liegen für dieses haploide Stadium kaum exakte biochemische Daten vor (LeStourgeon et al., 1973, Brand et al., 1975). Die genetischen Untersuchungen erstreckten sich nur auf morphologisch interessante Eigenschaften (vgl. Dee, 1973) und auf Antibiotikaresistenz (Haugli und Dove, 1972).

Andererseits ist es aber für die Aufklärung der Stoffwechselvorgänge während der Differenzierung von großem Interesse, auch Amöben eingehend genetisch und biochemisch zu unter-

suchen und mit dem diploiden Stadium vergleichen zu können, und zwar aus folgenden Gründen.
Für Plasmodien konnten während der Induktion der Sklerotienbildung sowohl im Hungerzustand als auch im Mannitsystem weitgehende Umstellungen im Stoffwechsel festgestellt werden (Hüttermann, 1973). Neben starken Änderungen in der Ultrastruktur (Goodman und Rusch, 1970) unter anderem verbunden mit dem Abbau von Glykogen und dem Aufbau von Polygalactoseschleim (McCormick et al., 1970) werden vor allem Proteine und Nucleinsäuren abgebaut. Nach 32 h Hunger bzw. Manniteinduktion sind 90% Spherulen entstanden und, gemessen am Gehalt wachsender Plasmodien, nur noch 64% DNA, 36% RNA und 55% Proteine nachweisbar (Sauer et al., 1970). Gleichzeitig erfolgte jedoch auch eine Synthese von Enzymproteinen (Hüttermann et al., 1971, Hüttermann, 1972).
Diese beträchtlichen Veränderungen werden mit Sicherheit durch Enzyme wie RNasen, Aminopeptidasen und Proteasen reguliert.

Für extra- und intrazellulare RNasen während des Wachstums von Plasmodien liegen bereits mehrere Untersuchungen verschiedener Autoren vor (Hiramaru et al., 1969, Braun und Behrens, 1969, Farr et al., 1972).
Darüber hinaus beschäftigte sich Brand (1974) mit dem Verhalten der Isoenzyme während der durch Hunger induzierten Sklerotienbildung. Von den in wachsenden Plasmodien nachgewiesenen drei Isoenzymen wurde nach 24 h Hunger nur noch eine Bande gefunden, die nach Reinigung auf ihre Substratspezifität untersucht wurde: Es handelt sich um ein endonucleolytisches Enzym, das bevorzugt Poly-I und Poly-U abbaut.

Neben den RNasen ändern auch die Aminopeptidasen ihre Substratspezifität während der Sklerotienbildung. Hoffmann und Hüttermann (1975) konnten zeigen, daß die unterschiedliche Aktivität gegenüber Nitroaniliden im Rohextrakt auf einer Änderung des Isoenzymmusters der Leucinaminopeptidase beruht.

Eine Dichtemarkierung der Enzyme ergab eine differentielle Enzymsynthese während der Sklerotienbildung, die vermutlich auf eine differentielle Genaktivität zurückzuführen ist.

Für Proteasen wurden bisher drei Isoenzyme im Kulturmedium von wachsenden Plasmodien gefunden (Farr et al., 1974). Das Verhalten dieser Enzyme während der diploiden Differenzierung wird zur Zeit in diesem Labor untersucht (Nuske, unveröffentlicht).

Für die Aufklärung der physiologischen Funktionen der drei Enzyme und ihrer Regulation während dieser Differenzierung wäre die Verwendung einer Mutante, der eines dieser Enzyme fehlt, sehr aufschlußreich. Es war das Ziel dieser Arbeit, Methoden zur Isolation solcher Mutanten zu finden und damit Hinweise auf eine mögliche Genaktivierung oder -inaktivierung zu erhalten.

Um die Enzymausstattung während des gesamten Generationszyklus verfolgen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit - außer der Ausarbeitung des axenischen Mediums - versucht, folgende Probleme zu lösen:

1. Wie sieht das Isoenzymmuster der Aminopeptidasen, RNasen und Proteasen bei axenisch wachsenden Amöben im Vergleich zu Plasmodien aus?
2. Läßt sich auch bei Amöben eine Induktion der Zystenbildung analog zur Spherulenbildung erreichen?
3. Wenn ja, wie verhalten sich die Isoformen obiger Enzyme während der haploiden Differenzierung (Amöben - Zysten) im Vergleich zur diploiden (Plasmodien - Sklerotien)?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendeter Organismus: Physarum Myxamöbenstamm RSD_4

Dieser heterothallische Kreuzungstyp (mt_1) wurde von F.B. Haugli aus dem Plasmodienstamm RS I (Wisconsin-Stamm) isoliert. Während RS I-Plasmodien in der logarithmischen Wachstumsphase einen DNA-Gehalt von 1,2 pg/Zellkern haben, enthalten Kerne von RSD_4-Amöben nur 0,6 pg (Mohberg und Rusch, 1971); sie sind somit haploid und für genetische Untersuchungen geeignet (Dee, 1973). Stammkulturen wurden freundlicherweise von Dr. F.B. Haugli, Tromsø, (Agarkulturen) und Dr. C.H.R. McCullough, Leicester, (Flüssigkeitskulturen) zur Verfügung gestellt.

2.2. Kulturbedingungen

2.2.1. Anzucht auf Agar mit Futterbakterien (Haugli, 1971)

a) Kulturmedien

Vollmedium-Agar (Wachstumsmedium): 2% Bacto-Agar, 0,1% Leberinfusion, 0,1% Hefeextrakt, 0,1% Glucose.
Der Feuchtigkeitsgehalt des Agars wurde nach dem Gießen standardisiert durch 24stündiges Aufbewahren der Platten bei Raumtemperatur und anschließende Vorratshaltung (bis zu zwei Monaten) im Kühlschrank.
Ca. 5×10^4 Zellen wurden zusammen mit ca. 10^{10} formalingetöteten E.coli (H/KB) auf dem Agar ausgestrichen.
Herstellung der formalininaktivierten Bakterien: E.coli KB wurde im Großansatz im 100 l - Fermenter in Trypton-Medium (1% Bacto-Trypton, 0,5% NaCl) bei 37° C angezüchtet. Dafür danke ich Herrn Dr. Brinkmann vom Institut für Mikrobiologie, Göttingen.
Nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wurden die Zellen durch Abzentrifugieren geerntet und tiefgefroren. Die

restlose Inaktivierung der Bakterien erfolgte durch Zugabe einer 2,5%igen Formaldehydlösung in TM-Puffer (10^{-2} M Tris, 10^{-2} M $MgSO_4$, pH 8.0). Diese Suspension wurde über Nacht bei 4^{o} C aufbewahrt, anschließend zweimal jeweils über Nacht mit dem doppelten Volumen TM-Puffer gewaschen und mit dem gleichen Puffer auf eine Dichte von ca. 5×10^{10} Zellen/ml eingestellt.

b) Transfer, Klonen und Inkubation der Zellen

Bei obigen Kulturbedingungen ist etwa 24 Stunden nach Inokulieren die logarithmische Wachstumsphase erreicht. Nach ca. 6 Tagen beginnen sich die Amöben zu enzystieren. Durch routinemäßigen Transfer alle drei Tage wurden die Amöben in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten.Dieses Klonen erfolgte mit der sogenannten "Zahnstochermethode": Die Zellen wurden mit einem sterilen Zahnstocher vom Rande eines Klones aufgenommen. Der Zahnstocher mit den daran haftenden Zellen wurde sodann in 0,25 ml einer E.coli H/KB-Suspension getaucht, die Amöben durch kurzes Schütteln verteilt und auf dem Vollmediumagar ausplattiert.
Die Inkubation erfolgte im Kühlbrutschrank bei 25^{o} C.

c) Ernten und Zählen der Zellen

Die Amöben wurden von der Agaroberfläche geerntet durch Aufpipettieren von 3 ml sterilem bidestilliertem Wasser und vorsichtiges Abreiben mit einem Edelstahlimpfhaken. Die so suspendierten Amöben wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1000 Upm in einer klinischen Zentrifuge (Hettich) von dem größten Teil der restlichen Bakterien befreit und konzentriert.
Die Zellen pro ml wurden in geeigneter Verdünnung im Haemazytometer (Neubauer, Tiefe: 0,05 mm) im Phasenkontrastmikroskop gezählt.

d) Replizieren von Klonen

Medium: 2% Wasseragar mit einer Auflage von 0,2 ml E.coli H/KB-Suspension.
Die so vorbereitete Agarplatte wird auf ein Raster mit 24 Quadraten gelegt und die Klone von einer "masterplate" in definierter Reihenfolge mit der "Zahnstochermethode" auf die Rasterplatte repliziert. Die "masterplate" wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

e) Titer-Platten (zum Screening von Plaquesize-Mutanten und zum Klonen)

Etwa 100 Zellen wurden auf 2%igem Wasseragar plattiert. Auf diesem nährstoffarmen Agar bilden die Amöben nach sieben Tagen Inkubation scharfumrissene Plaques. Zum Beobachten der Amöbenklone auf der Agarplatte diente ein Stereomikroskop der Fa. Wild, Heerbrugg (50fache Vergrößerung).

2.2.2. Anzucht im axenischen Flüssigkeitsmedium

a) Inkubation

Ruhekulturen: 150 ml Meplats Schraubkappenflaschen (achtkantig) mit 6 - 8 ml Amöbensuspension wurden auf der Breitseite liegend bei 25° C im Dunkeln inkubiert.
Schüttelkulturen: 5 ml Amöbensuspension in 125 ml Erlenmeyerkolben mit Polyurethanschaumstopfen und Edelstahlhülsen verschlossen (Bellco) wurden auf einem Rotationsschüttler (New Brunswick Scientific) bei ca. 72 Upm bei 25° C im Dunkeln inkubiert.

b) Transfer der Zellen

Beim Überimpfen wurde das Inokulum so bemessen, daß die Anfangsdichte der neuen Kultur mindestens 10^6 Zellen pro ml

betrug. Um die Amöben in der exponentiellen Wachstumsphase zu erhalten, wurden sie spätestens nach 6 Tagen übergeimpft (vgl. Abb. 2).
Die Stammkulturen wurden alle zwei Monate subkultiviert,um eventuell mögliche alterungsbedingte Veränderungen der Amöben auszuschließen (Adler und Holt, 1974).

c) Medien

Die Zusammensetzung der getesteten Medien ist in Tab. 1 angegeben. Alle in der Tabelle verwendeten Abkürzungen sind unter dem Abschnitt 2.9 "Chemikalien" angegeben. Die Mengenangaben beziehen sich auf 1000 ml.
Es wurde bidestilliertes Wasser, mit 1 % Göttinger Leitungswasser versetzt, verwendet.
Die Autoklavierzeit betrug 15 min bei 120° C.

Tab. 1: Zusammensetzung der getesteten Medien

Bezeichnung der Medien	SD	SM3
Literatur	Henney und Henney, 1968	McCullough, unveröffentlicht
pH	4.3 - 4.5	4.3 - 4.5
Inkubation	Ruhekultur	Schüttelkultur, 72 Upm
Stickstoff-haltige Komponenten	Kaseinhydrolysat, vitaminfrei 5 g	RSA 31,2 g
Vitamin-haltige Komponenten	Hefeextrakt 5 g Haematin 0,5 mg	REE 1,2 g Haematin 0,5 mg
Glucose	5 g	4,5 g
Salze	Citronens. 2,98 g K_2HPO_4 3,31 g NaCl 0,25 g $CaCl_2$ 0,05 g $MgSO_4$ 0,1 g pH 4.0	Citronens. 2,1 g KH_2PO_4 1,36 g pH 5.0 $CaCl_2$ 0,14 g $MgSO_4$ 0,12 g
Spuren-elemente	Citronens. 5,0 mg $ZnSO_4$ 5,0 mg $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 1,0 mg $CoCl_2$ 0,05 mg $CuSO_4$ 0,25 mg $MnSO_4$ 0,05 mg $NaMoO_4$ 0,05 mg H_3BO_3 anhydr. 0,05 mg	$ZnSO_4$ 0,84 mg $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0,019 mg bzw. $FeCl_2$ 0,0097mg $CoCl_2$ 0,047 mg $CuCl_2$ 0,017 mg $MnCl_2$ 19,7 mg

Fortsetzung Tab. 1

Bezeichnung der Medien	DM1			GT1		
Literatur	McCullough, unveröffentlicht			Goodman, 1972		
pH	4.3 - 4.5			6.35		
Inkubation	Schüttelkultur 72 Upm			Schüttelkultur 100 Upm		
Stickstoff-haltige Komponenten	RSA	31,2	g	RSA	30	g
	Glutamins.	0,75	g	Pepton	3,0	g
	Glycin	0,125	g			
	L-Methionin	0,025	g			
Vitamin-haltige Komponenten	REE	1,2	g	REE	2,3	g
	Thiamin	0,01	g	Leberinfusion	3,0	g
	(Haematin	0,5	mg)			
Glucose		(4,0	g)		2,7	g
Salze	Citronens.	885	mg			
	KH_2PO_4	0,5	mg	KH_2PO_4	180	mg
	$CaCl_2$	225	mg	Na_2HPO_4	600	mg
	$MgSO_4$	150	mg	pH 6.9		
Spuren-elemente	$ZnSO_4$	8,5	mg	NaCl	60	mg
	$FeCl_2$	15,0	mg	$FeSO_4$	2	mg
	EDTA (Di-Na-Salz)	56,0	mg	$CaCl_2$	1,5	mg

Fortsetzung Tab. 1

Bezeichnung der Medien	HS		HB	
Literatur	Haugli, unveröffentlicht		Haugli, unveröffentlicht	
pH	6.0		6.0	
Inkubation	Schüttelkultur 100 Upm		Schüttelkultur 100 Upm	
Stickstoff-haltige Komponenten	RSA	32 g	RSA	5 g
	Trypton	2,5g		
Vitamin-haltige Komponenten	REE	8 g	Leberinfusion	0,5 g
	Hefeextrakt	0,4 g	E.coli H/KB 5 x 10^{10}/ml	
Glucose		2,5 g		2,5 g
Salze	Citronensäure	0,8 g		
	KH_2PO_4	0,5 g		
Spuren-elemente	$ZnSO_4$	7 mg		
	$FeCl_2$	12 mg		
	$MnCl_2$	18 mg		
	$MgSO_4$	120 mg		
	$CaCl_2$	120 mg		

Anmerkung zu Tab. 1:
Das für die vergleichenden biochemischen Untersuchungen verwendete proteinreiche SM3-Medium wurde freundlicherweise von Frau Dr. McCullough zur Verfügung gestellt, in Göttingen erneut sterilfiltriert und bis zum Gebrauch tiefgefroren.

2.2.3. Induktion der Zystenbildung

7 - 9 ml SD-Amöbenkulturen der Dichte 10^7 Zellen pro ml wurden durch 1-minütiges Abzentrifugieren bei 1000 Upm (Hettich, klinische Zentrifuge) geerntet und das Amöbensediment in der gleichen Menge eines der im Abschnitt "Ergebnisse" aufgeführten Medien aufgenommen. Die Unterscheidung von Amöben und Zysten erfolgte im Phasenkontrast entweder aufgrund ihrer unterschiedlich lichtbrechenden Zellhüllen oder spezifischer durch Anfärben mit einer 0,2 %igen Lösung von Trypan-Blau in 0,025 %iger wäßriger Cemulsol NPT 12-Lösung.

2.3. Herstellung der Enzymextrakte

Es wurden jeweils Kulturen der Dichte 8 x 10^6 - 10^7 Zellen pro ml verwendet.
Das durch 10-minütiges Abzentrifugieren bei 1000 Upm gewonnene Amöbensediment wurde in der gleichen Menge Tris-acetatpuffer pH 7 suspendiert. Bei Verwendung der Extrakte zur isoelektrischen Fokussierung war die Konzentration des Puffers 0,01 M, sonst 0,1 M. Die so hergestellte Amöbensuspension konnte ohne Aktivitätsverlust bei -20° C aufbewahrt werden, sofern das Einfrieren und Auftauen jeweils schnell in flüssigem Stickstoff bzw. unter warmem Wasser erfolgte.
Die frische, bzw. schnell aufgetaute Amöbensuspension wurde mit einer 1,5 %igen Lösung Cemusol NPT 12 auf eine Endkonzentration von 0,15% gebracht, 30 min auf Eis gerührt und anschließend 3 x 15 sec mit Ultraschall homogenisiert (Branson Sonifier, Mikrospitze, Intensitätseinstellung 7). Dieses Rohhomogenat wurde 30 min bei 100 000 g (4° C) abzentrifugiert und der Überstand (= Enzymextrakt) verwendet.

Das für die Untersuchungen der extrazellularen Enzymaktivitäten dienende Kulturmedium wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und unverdünnt in die Enzymtests eingesetzt.

2.4. Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.4.1. Aminopeptidase

Prinzip: Bei der enzymatischen Hydrolyse von Aminosäure-4-nitroanilid-Derivaten wird gelbes 4-Nitroanilin freigesetzt, dessen Konzentration durch photometrische Messung bei 405 nm ermittelt werden kann (Erlanger et al., 1961, Tuppy et al., 1962, Pollack und Dumsha, 1974). Der molare Extinktionskoeffizient für 4-Nitroanilin bei 405 nm beträgt 9620 l/Mol·cm (Wachsmuth et al., 1966).

Testbedingungen (Hoffmann, 1975):

Substratlösung:	0,5 ml (Konzentration: Tab. 2)
Enzymextrakt:	20 - 100 µl
Inkubationszeit:	10 - 60 min bei 37° C
Abstopplösung:	0,5 ml Dimethylformamid
Kontrolle:	Der Enzymextrakt wurde erst nach dem Abstoppen der Reaktion zugegeben.

Tab. 2: Die Konzentrationen der verwendeten Derivate des 4-Nitroanilins und ihre Abkürzungen

I. Nitroanilide von unsubstituierten Aminosäuren:

Substrat	Abkürzung	Konzentration mM
L-Alanin-4-nitroanilid·HCl	Ala-NA	3
Glycin-4-nitroanilid·HBr	Gly-NA	3
L-Leucin-4-nitroanilid	Leu-NA	1,5
L-Lysin-4-nitroanilid·2 HBr	Lys-NA	1,5
L-Phenylalanin-4-nitroanilid	Phe-NA	0,5
L-Prolin-4-nitroanilid	Pro-NA	3
L-Tyrosin-4-nitroanilid	Tyr-NA	1

II. Nitroanilid einer N-substituierten Aminosäure:

N-Acetyl-L-alanin-4-nitroanilid gesättigt

III. Nitroanilid eines Dipeptides (in 0,1 M Tris-Acetatpuffer pH 7):

L-Alanyl-L-alanin-4-nitroanilid Ala-Ala-NA

Alle Substrate (außer Ala-Ala-NA) wurden als Stammlösungen 25 - 100 mM in Methanol oder Aceton gelöst und bei -20° C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden die Substrate mit 0,1 M Tris-Acetatpuffer pH 8.0 bis zur entsprechenden Konzentration verdünnt.

2.4.2. Phosphodiesterase (modifizierte Methode nach Koerner und Sinsheimer, 1957)

Nach gleichem Prinzip wurde die Aktivität der Phosphodiesterase bei folgenden Testbedingungen photometrisch (410 nm) ermittelt (Hüttermann, 1972).

Substratlösung:	0,85 mg Bis-p-Nitrophenylphosphat in 0,5 ml Citronensäure/PO_4-Puffer, pH 5.0, bzw. Phosphatpuffer, pH 3.8 (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.4.3.)
Enzymextrakt:	50 - 100 µl
Inkubation:	60 min bei 37° C
Abstopplösung:	0,5 ml 1 M Na_2CO_3
Kontrolle:	Der Enzymextrakt wurde erst nach dem Abstoppen zugegeben.

2.4.3. Ribonuclease (modifizierte Methode nach Tuve und Anfinsen, 1960)

Prinzip: Niedermolekulare RNA aus Hefe wird durch RNase hydrolysiert, der Überschuß langkettiger RNA von den Oligonucleotiden durch Ausfällen getrennt. Die Konzentration des Hydrolysats kann photometrisch bei 260 nm ermittelt werden. Eine Enzymeinheit bewirkt eine Extinktionszunahme bei 260 nm von 0,001/100 sec (Halvorson und Ellias, 1958).

Testbedingungen (Brand, 1974):

Substratlösung:	0,5 mg niedermolekulare RNA aus Hefe in 0,25 ml Puffer (0,15 µM Na_2HPO_4, 16,5 µM KH_2PO_4, 2,5 µM EDTA (Di-Na-Salz)), pH 3.8
Enzymextrakt:	100 µl
Inkubation:	60 min bei 37° C
Fällungsreagenz:	3,5 ml 0,45 M $HClO_4$ (0,13 %ig an Uranylacetat)
Zentrifugation:	Nach 30 min Kühlung auf Eis wurde 30 min bei 2000 g (4° C) zentrifugiert. Ca. 1 ml des Überstandes diente zur Extinktionsmessung.

Kontrolle: Der Enzymextrakt wurde erst nach dem Ausfällen hinzugegeben.

In ähnlicher Weise wurde der Abbau von Polynucleotiden durch RNase getestet:

Substrat: 80 µl Polynucleotid (2 mg/ml) in bidest. Wasser

Enzymextrakt: 20 µl der vereinigten Peakfraktionen aus den präparativen isoelektrischen Fokussierungen

Fällungsreagenz: 1,05 ml Uranylacetat/$HClO_4$

Alle weiteren Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie im oben beschriebenen Test.

2.4.4. Protease: (modifizierte Methode nach Tomarelli et al., 1949)

Prinzip: Durch Kuppeln eines diazotierten Arylamins an ein Protein erhält man ein chromophores Azoprotein, das in starken Säuren unlöslich ist. Bei proteolytischer Spaltung dieses Azoproteins entstehen gefärbte Reaktionsprodukte, die in starken Säuren (z.B. $HClO_4$) löslich sind. Fällt man das überschüssige Azoprotein mit $HClO_4$ aus, so ist nach Abzentrifugieren die Farbintensität der überstehenden Lösung ein direktes Maß für die proteolytische Aktivität des Enzyms.

Testbedingungen (Nuske, unveröffentlicht):

Substrat: 1 %ige wäßrige Azohämoglobinlösung ($A^{1\ \%}_{500}$ = 42,35 OD) - freundlicherweise von Herrn Dr. Nuske zur Verfügung gestellt - wurde im Verhältnis 1 : 1 mit 0,025 M Citronensäure/Citratpuffer, pH 4.1, verdünnt. Der pH dieser Mischung wurde sodann mit 0,5 M HCl auf pH 4.1 eingestellt. Pro Testansatz (in Eppendorf Reaktionsgefäßen) wurde 0,5 ml dieser Substratlösung eingesetzt.

Enzymextrakt: 50 - 100 µl

Inkubation: 60 min bei 37° C

Fällungsreagenz: 250 µl 32,5 %ige $HClO_4$

Zentrifugation: Nach 30 min Kühlung auf Eis wurde 10 min bei 8000 g zentrifugiert.

Testansatz zur photometrischen Messung: 500 µl der überstehenden Lösung wurden mit 250 µl 5 N NaOH gut gemischt und nach mindestens 10-minütigem Stehen (danach ist die Farbintensität für 24 h konstant) bei 500 nm gemessen.

Kontrolle: Die Enzymzugabe erfolgte erst nach dem Ausfällen.

Alle Messungen wurden mit einem Zeiss PQM II Spektralphotometer in 1 ml-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

2.5. Screening auf Enzymmangelmutanten mit histochemischen Enzymtests

Die mit 24 Klonen (Ø ca. 0,5 cm) bewachsenen Replicaplatten dienten für alle Enzymtests als Ausgangsmaterial. Das entsprechende Substrat wurde jeweils in 0,7 %igem Agar mit 0,15 % Cemulsol NPT 12 gelöst bzw. suspendiert. Von dieser Mischung wurden 2,5 - 3,0 ml auf die Replicaplatte pipettiert.

2.5.1. Test auf $RNase^{(-)}$- und $DNase^{(-)}$- Mutanten (modifizierte Methoden nach Gesteland, 1966)

Prinzip: Langkettige Nucleinsäuren werden durch 1 N HCl ausgefällt, wodurch sich ein weißer Niederschlag auf dem Agar bildet, während durch Nucleasen abgebaute kurzkettige Bruchstücke löslich sind. Die Wildtypzellen bauen die Nucleinsäuren ab, so daß sie an den hellen, durchscheinenden Höfen von den Enzymmangelmutanten unterschieden werden können.
Die Reaktionsbedingungen dieser und der folgenden Enzymtests sind in Tab. 3 angegeben.

2.5.2. Tests auf Phosphatase$^{(-)}$- Mutanten (modifizierte Methoden nach Messer und Vielmetter, 1965, und Ortiz, 1974)

Die Methode von Messer und Vielmetter beruht auf folgendem Prinzip: Bei der Spaltung von ∝-Naphthylphosphat durch Phosphatase entsteht freies ∝-Naphthol, das mit dem Diazoniumsalz Fast Blue RR zu einem braunroten Azofarbstoff gekuppelt wird.

Die andere Methode nach Ortiz, die ein Screening bei lebenden Amöben ermöglicht, beruht auf der Spaltung von 4-Methylumbelliferylphosphat in fluoreszierendes Methylumbelliferon.

2.5.3. Test auf Alaninaminopeptidase$^{(-)}$- Mutanten (modifizierte Methode nach Nachlas et al., 1957)

Prinzip: Diese Methode beruht ebenfalls auf der Spaltung eines -Naphthylderivates und anschließendem Kuppeln des -Naphtols mit einem geeigneten Diazoniumsalz.

Das Prinzip eines weiteren Tests (Erlanger et al., 1961) wurde bereits unter Abschnitt 2.4.1. erläutert.

Tab. 3: Testbedingungen bei den histochemischen Enzymtests

Getestetes Enzym	RNase	DNase
Literatur	Gesteland, 1966	Hüttermann, unveröffentlicht
Substrat	RNA Grade VI	DNA Grade VI
Substrat-konzentration	3 %	2 -8 %
Puffer, pH	Phosphatpuffer pH 3.8 Zusammensetzung: Abschnitt 2.4.3.	0,3 M Ameisensäure/ Formiatpuffer pH 4.0
Fällungsreagenz	1 N HCl	1 N HCl
Inkubationszeit, Temperatur	12 h 40° C	4 h 40° C
Bemerkungen zur Ausführung der Tests	Das Substrat ist hitzestabil, daher wurde es mit dem Agar zusammen erhitzt und gelöst.	Das Substrat ist hitzelabil, daher wurden Substratlösung und Soft-Agar/Detergenzlösung in doppelter Konzentration angesetzt und nach dem Abkühlen der Agarlösung zu gleichen Teilen gemischt.

Fortsetzung der Tab. 3

Getestetes Enzym	Alaninaminopeptidase	Alaninaminopeptidase
Literatur	Nachlas et al., 1957	Erlanger et al., 1961
Substrat	Alanin-naphthylamid	Alanin-4-nitroanilid
Substrat-konzentration	0,04 - 0,4 %	0,2 - 0,4 %
Puffer, pH	0,1 M Tris-Acetat pH 6.5 bzw. pH 8.0	0,1 M Tris-Acetat pH 8.0
Diazoniumsalz	Fast Garnet GBC Fast Black K Fast Blue B Fast Blue BB Fast Red RC Fast Red TR 0,5 %	-
Inkubationszeit, Temperatur	30 min 24° C	bis zu 48 h 24° C bzw. 40° C
Bemerkungen zur Ausführung der Tests	Der Puffer ist 0,14 %ig an NaCl. Substrat und Diazoniumsalz werden gemeinsam gelöst (in doppelter Konzentration) und mit der erkalteten Agarlösung vereinigt.	Die Ausführung erfolgte wie unter "DNase" beschrieben.

Fortsetzung der Tab. 3

Getestetes Enzym	Phosphatase	Phosphatase
Literatur	Messer und Vielmetter, 1965	Ortiz, 1974
Substrat	α-Naphthylphosphat	4-Methylumbelliferylphosphat
Substratkonzentration	0,13 %	0,1 %
Puffer, pH	0,1 M Tris-Maleat pH 5.5	0,1 M Tris-Maleat pH 5.5
Diazoniumsalz	Fast Blue RR 0,13 %	-
Inkubationszeit, Temperatur	2 h 40° C	15 - 30 min 25° C
Bemerkungen zur Ausführung der Tests	Substrat, Diazoniumsalz und Agar wurden jeweils in dreifacher Konzentration gelöst bzw. suspendiert und die Lösungen nach dem Erkalten mit der Agarlösung vereinigt.	Substrat und Agarlösung wurden getrennt hergestellt und nach Erkalten vereinigt. Die Beobachtung der Fluoreszens erfolgte bei 336 nm.

2.6. Präparative isoelektrische Fokussierung im Saccharose-Dichtegradienten

Vorversuche wurden mit einer Mikrotechnik (Kint, 1975) durchgeführt, die eine schnellere und materialsparendere Ermittlung der Lage der Isoenzymbanden innerhalb des entsprechenden pH-Gradienten erlaubten.
Die Hauptversuche zur genauen Charakterisierung und präparativen Aufarbeitung der Isoenzyme erfolgten in größerem Maßstab nach der Standardmethode (Haglund, 1967) in einer 110 ml Fokussierapparatur der Firma LKB, Stockholm.
Die Versuchsbedingungen der Fokussierungen sowohl im Mikro- als auch im Makromaßstab sind in Tab. 4 angegeben.

Tab. 4: Versuchsbedingungen bei den isoelektrischen Fokussierungen

I. nach Kint (12 ml Säule)

	Aminopeptidase	Protease
Ampholine[1]	1 % pH 3.5 - 10	1 % pH 3.5 - 10 0,2 % pH 2.5 - 4
Anode	oben: 1 % H_2SO_4	
Kathode	unten: 0,8 % NaOH in 47 %iger Saccharoselösung	
leichte Lösung	2 ml Enzymextrakt 4 ml bidest. Wasser Die Lösungen waren jeweils 40 mM an Dithioerythrit.	3,5 ml Enzymextrakt 2,5 ml bidest. Wasser
schwere Lösung	6,5 ml 47 %ige Saccharoselösung	
Fraktionsvolumen[2]	7 Tropfen = ca. 0,3 ml	
Spannung	400 V	
Stromstärke	anfangs 4 mA am Ende 0,1 mA	anfangs 6 mA am Ende 0,1 mA
Laufzeit	18 h	

Fortsetzung Tab. 4

II. nach Haglund (110 ml Säule)

	Aminopeptidase	RNase
Ampholine[1]	1 % pH 5.0 - 7.0 0,1 % pH 3.5 -10.0	1 % pH 3.5 - 10.0 0,1 % pH 2,5 - 4.0
Anode	unten: 1 % H_2SO_4 in 47 %iger Saccharoselösung	oben: 1 % H_2SO_4
Kathode	oben: 4 % Triaethylamin	unten: 4 % Triaethylamin in 47 %iger Saccharoselösung
leichte Lösung	10 ml Amöbensuspension der Dichte 2×10^7 Zellen/ml bzw. 40 ml Medium, über Sephadex-G_{25} entsalzt, wurde jeweils auf 55 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt. Die Lösungen waren jeweils 40 mM an Dithioerythrit.	
schwere Lösung	55 ml 47 %ige Saccharoselösung	
Fraktionsvolumen[2]	7 Tr. = ca. 0,3 ml	20 Tr. = ca. 1 ml
Spannung	1. - 16. h 700 V 17. - 60. h 900 V	1. - 16. h 400 V 17. - 60. h 700 V
Stromstärke	anfangs ca. 3 mA am Ende ca. 0,5 mA	anfangs ca. 6 mA am Ende ca. 0,5 mA
Laufzeit	60 h	38 h

[1] Es wurden Ampholine (40 %) der Firma LKB verwendet.

[2] Die Abtropfgeschwindigkeit betrug ca. 1,5 ml/min. Der pH-Gradient wurde durch Messung in jeder zweiten Fraktion bei 4° C (die Werte wurden auf 20° C korrigiert) mit einem pH-Meter mit Mikroelektrode ermittelt.

2.7. Bestimmung der Substratspezifität der RNase- und Aminopeptidase-Isoenzyme durch Hochspannungselektrophorese

Die Versuche wurden in einer Apparatur der Firma Savant Instruments, Inc., Hicksville, New York, mit Elektrophoresepapier der Firma Schleicher und Schüll (Typ: 2043 bmg, Größe: 45 x 65 cm) durchgeführt.

2.7.1. Trennung von Aminosäuren und Dipeptiden

Bei einem pH von 3.5 wandern stark basische Aminosäuren, wie z.B. Lysin und Histidin, zur Kathode, die stark sauren Aminosäuren, wie z.B. Asparagin- und Glutaminsäure, zur Anode, während alle übrigen Aminosäuren in der Nähe des Startflecks liegenbleiben. Die Dipeptide verhalten sich entsprechend ihrer Aminosäurezusammensetzung.
Läßt man eine Aminosäurestandardlösung als Vergleich mitlaufen, so lassen sich die Spaltprodukte der Dipeptide eindeutig identifizieren.
Ebenso kann man durch einen Vergleich der Größe und Farbintensität der Flecken das Maß der Hydrolysegeschwindigkeit abschätzen.
Versuchsbedingungen: (Godfrey, unveröffentl. Angaben)
Substrate: Dipeptide und Carbobenzoxydipeptide wurden in einem Vorversuch auf ihre Reinheit getestet. Einige Dipeptide zeigten eine im Chromatogramm sichtbare Verunreinigung durch Aminosäuren und wurden daher nicht verwendet. Die übrigen Substrate wurden 2 mM in bidest. Wasser gelöst, in 5 ml Portionen bei -20° C aufbewahrt und bei Bedarf schnell aufgetaut.
Als Standard diente eine Lösung von 12 im Test vorkommenden Aminosäuren (1 mM) in doppelt destilliertem Wasser.

Tab. 5: Die verwendeten Substrate und ihre im Text benutzten Abkürzungen

I. Unsubstituierte Dipeptide

Substrat	Abkürzung
L-Arginyl-L-Asparaginsäure	Arg-Asp
α-L-Aspartyl-L-Leucin	Asp-Leu
L-Histidyl-L-Leucin	His-Leu
L-Methionyl-L-Glutaminsäure	Met-Glu
L-Phenylalanyl-L-Glutaminsäure	Phe-Glu
L-Prolyl-L-Glutaminsäure	Pro-Glu
L-Tyrosyl-L-Glutaminsäure	Tyr-Glu
L-Tryptophyl-L-Glutaminsäure · 2 H_2O	Try-Glu
L-Valyl-L-Lysin	Val-Lys

II. N-substituierte Dipeptide

N-Carbobenzoxy-Glycyl-L-Phenylalanin	CBZ-Gly-Phe
N-Carbobenzoxy-L-Alanyl-L-Glutaminsäure	CBZ-Ala-Glu
N-Carbobenzoxy-L-α-Glutamyl-L-Tyrosin	CBZ-Glu-Tyr
N-Carbobenzoxy-L-Leucyl-Glycin	CBZ-Leu-Gly

Testansatz:

Die Menge des in den Test eingesetzten Enzymextraktes wurde nach der Aktivität gegenüber Leucin-p-Nitroanilid bemessen. Sie betrug in allen Tests mindestens 5 mU. 50 µl der entsprechend verdünnten Enzymlösung wurden mit 50 µl 0,1 M Tris-Acetatpuffer auf pH 8 gebracht und 1 - 2 h mit 0,5 ml Substratlösung bei 37° C inkubiert. Eine Kontrolle enthielt nur das Substrat in Puffer gelöst.

Elektrophorese:

Puffer:	Essigsäure 96 %ig	130 ml
	Pyridin	13 ml
	Dest. Wasser ad	5000 ml

Spannung: 2700 V

Stromstärke: 75 - 120 mA

Dauer: 45 - 50 min

Auftragsvolumen: 30 µl/Startfleck

Entfernung der Startflecken zueinander: 2,5 cm

Trocknung der Chromatogramme: 30 min bei 100° C

Detektion:	Ninhydrin	1 g
	Aethanol	700 ml
	2,4,6-Collidin	29 ml
	Essigsäure	210 ml

2.7.2. Trennung von Mono- und Dinucleotiden

Nach ähnlichem Prinzip läßt sich auch die Spaltung von Dinucleotiden durch Hochspannungselektrophorese verfolgen:

Substrate:

Die Dinucleotide wurden in bidest. Wasser gelöst (5 mg/ml), 50 µl dieser Lösung wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt, lyophilisiert und anschließend bis zum Gebrauch bei -20° C aufbewahrt.

Tab. 6: Die verwendeten Dinucleotide und ihre im Text benutzten Abkürzungen

Adenylyl-(3'→5')-Adenosin, NH_4-Salz	ApA
Adenylyl-(3'→5')-Cytidin, Mono-NH_4-Salz	ApC
Adenylyl-(3'→5')-Uridin, frei Säure	ApU
Cytidylyl-(3'→5')-Cytidin, Mono-NH_4-Salz	CpC
Cytidylyl-(3'→5')-Guanosin, NH_4-Salz	CpG
Guanylyl-(3'→5')-Cytidin	GpC
Guanylyl-(2'→5')-Cytidin	GpC (2'→5')
Guanylyl-(3'→5')-Uridin, NH_4-Salz	GpU
Uridylyl-(3'→5')-Adenosin	UpA
Uridylyl-(3'→5')-Cytidin	UpC
Uridylyl-(3'→5')-Guanosin, freie Säure	UpG
Uridylyl-(3'→5')-Uridin	UpU

Testansatz:

250 µg lyophilisiertes Substrat wurde in 20 µl des entsprechenden Puffers (pH 3.0 bzw. pH 5.0, siehe "2.4.3.") gelöst und diese Substratlösung mit 30 µl Enzymextrakt aus den Peakfraktionen einer isoelektrischen Fokussierung 1 h bei 37° C inkubiert.

Elektrophorese:

Puffer:	5 %ige Essigsäure/Triaethylamin pH 3.5
Spannung:	2000 V
Stromstärke:	50 - 100 mA
Dauer:	120 min
Auftragsvolumen:	30 µl/Startfleck
Entfernung der Startflecken zueinander:	2,5 cm
Trocknung des Chromatogramms:	30 min bei 100° C
Detektion:	1. UV-Licht (254 nm): alle Di- und Mononucleotide fluoreszieren blau.
	2. Guanosin fluoresziert hell nach Behandlung mit rauchender HCl.

2.8. Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie während der Enzystierung

2.8.1. Fixierung von Amöben und Zysten für die Rasterelektronenmikroskopie (modifizierte Methode nach George et al., 1972)

a) Im Flüssigkeitsmedium:

6 Tage alte Kulturen der Dichte 10^7 Zellen pro ml bzw. 24 h mannitinduzierte Kulturen wurden über Sartorius Membranfiltern (Porengröße 45 /um) abgesaugt und durch Eintauchen in 2-Methylbutan, das in einem Bad von flüssigem Stickstoff auf -150° C herunter gekühlt war, schnell eingefroren. Die Filter wurden bis zur Gefriertrocknung auf Trockeneis aufbewahrt. Die so vorbereiteten Proben wurden im WKF Gefriertrockner L 5 bei einer Kammertemperatur von -60° C lyophilisiert.

b) In Agarkulturen:

Auf Vollmedium-Agar wurde ein Membranfilter (s.o.) gelegt und die Amöben mit dem Bakterienrasen auf dem Filter ausgestrichen. Nachdem sich Klone von ca. 0,5 cm Durchmesser gebildet hatten (ca. 4 Tage) wurden die bewachsenen Filter nach Markierung der Klone wie unter Abschnitt 2.8.1. a) angeben verarbeitet. Die Filter mit den gefriergetrockneten Zellen wurden auf einen Objektträger geklebt und im Exsikkator auf $CaCl_2$ bei 4° C aufbewahrt.

c) Bedampfen und Fotografieren der Proben:

Die Bedampfung der fixierten Zellen erfolgte jeweils 2 x 3 min mit Gold bis zu einer Schichtdicke von ca. 300 Å im Sputtergerät.
Untersucht und fotografiert wurden die Proben im Institut für Geologie der Universität Göttingen mit einem Cambridge Stereoscan MARK II A bei einer Strahlspannung von 10 - 30 kV.

2.8.2. Fixierung von Amöben und Zysten für die Transmissionselektronenmikroskopie

Es wurden folgende Proben vorbereitet:
a) Eine 5 Tage alte SD-Flüssigkeitskultur der Dichte 8 x 10^6 Zellen pro ml wurde 1 min bei 1000 Upm abzentrifugiert und mit dem gleichen Volumen 0,5 M Mannit-Salzlösung zur Zystenbildung induziert. Nach 24 h wurde die Kultur fixiert.
Als Kontrolle dienten:
b) eine SD-Flüssigkeitskultur des gleichen Alters und der gleichen Dichte,
c) eine 30 Tage alte SD-Flüssigkeitskultur,
d) Amöben und Zysten von der Agarplatte, die mit kaltem bidest. Wasser geerntet wurden.

Alle Kulturen wurden in gleicher Weise mit 2,5% Glutaraldehyd und 1% OsO_4 fixiert. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat zweifach nachkontrastiert. Eingebettet wurden die Proben in Epon 812 nach einer Methode von Luft (1961). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss EM 9S-2 angefertigt.

2.9. Chemikalien

Verwendete Chemikalien	Bezeichnung der Firmen
Actinomycin C	Bayer, Leverkusen
Adrenalin	Serva, Heidelberg
Ampholine 40%	LKB, Stockholm
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Brij 35 und 58	Serva, Heidelberg
Carbobenzoxydipeptide	Sigma, St. Louis
Cemulsol NPT 12	Melle Bezons, Frankreich
Cycloheximid	Serva, Heidelberg
DNA Grade VI	Sigma St. Louis
Diazoniumsalz	Serva, Heidelberg

Verwendete Chemikalien	Bezeichnung der Firmen
Dimethylformamid	Serva, Heidelberg
Dipeptide	Serva, Heidelberg
Haematin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Detroit
Kaseinhydrolysat, vitaminfrei	Difco, Detroit
Leberinfusion	Oxoid, London
L-Methionin	Fluka, Schweiz
4-Methyl-umbelliferyl-phosphat	Serva, Heidelberg
Pepton	Difco, Detroit
Polynucleotide	Sigma, St. Louis
RNA aus Hefe, niedermolekular, Grade VI	Serva, Heidelberg
Rinderembryoextrakt (REE)	Grand-Island-Biol. Co., New York
Rinderserumalbumin Cohn Fr. V (RSA)	Sigma, St. Louis
Sephadex G-25	Pharmacia, Schweden
Taurin	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen (Reinheitsgrad: pro analysi).

3. ERGEBNISSE

3.1. Screening auf Enzymmangelmutanten

Zu Beginn der Arbeit wurde zunächst der direkte Weg versucht, um Enzymmangelmutanten von Amöben herzustellen: Mutagenese von Amöben, "BUdR-Suicide"-Anreicherung und direktes Screening von replizierten Amöbenklonen auf Agarplatten.

3.1.1. Anreicherung von Enzymmangelmutanten mit der "BUdR-Suicide"-Methode

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, Zellen durch Einbau von 5-Bromdesoxyuridin statt Thymidin in ihre DNA lichtempfindlich zu machen und somit bei darauffolgender Belichtung (310 nm) abzutöten. Da nur wachsende Zellen BUdR einbauen, kann man eine 10^3 - 10^4fache Anreicherung von Mutanten erzielen, wenn man Bedingungen schafft, bei denen Enzymmangelmutanten nicht wachsen können. Es wurde also folgendermaßen angereichert: Nach Mutagenese mit N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin (NMG) sowie Inkubation mit Coffein (um den bei Physarum Amöben sehr wirksamen "Reparierмechanismus" zu hemmen), wurden die Zellen 2 Teilungszyklen lang auf Vollmediumagar gezogen, um die Mutation zu manifestieren. Darauf wurden die Klone auf 5x in bidest. Wasser gewaschenen Agar übergeimpft, dem als Futter ein Bakterienrasen von formalingetöteten, 10x sehr sorgfältig gewaschenen (um niedermolekulare Stoffe restlost zu entfernen) BUdR-inkorporierten E.coli aufgelagert war.

Durch Abwesenheit von jeglichen niedermolekularen Substanzen sollten RNase- und Protease-Enzymmangelmutanten auf dem hydrophoben Agar entweder gar nicht oder nur sehr langsam wachsen. Der Wildtyp sollte ein schnelles Wachstum und somit reichlichen Einbau von BUdR zeigen.
Nach anschließendem Bestrahlen bei 310 nm (durch eine Küvette mit 10 mM Thymidin) wurde eine 10^3 - 10^4fache Inaktivierung

der gewachsenen Wildtypzellen beobachtet.
Die Mangelmutanten sollten zwischen den jetzt noch überlebenden Wildtypzellen an ihren kleineren Plaques auf gereinigtem Wasseragar erkannt werden. Als Kontrolle für eine effektive Anreicherung durch die BUdR-Suicide-Technik diente die Anzahl der Plaque-size-Mutanten, die durch Auslassen dieses Selektionsschrittes erreicht worden war: Im Vergleich zu der normalerweise zu erreichenden Rate von Plaque-size-Mutanten (Haugli, 1971) war eine etwa 100-fache Anreicherung dieses Phänotyps durch obige Methode erzielt worden.

Auf diese Art wurden von Prof. Hüttermann und Dr. Haugli aus 3×10^7 mutagenisierten Klonen 30 000 angereichert, von denen 300 auch nach Subkultivierung stabile Plaque-size-Mutanten selektioniert wurden, die nun mit den im Abschnitt 2.5. beschriebenen Methoden auf Enzymmangel getestet wurden.

3.1.2. Test auf RNase$^{(-)}$-Mutanten

Dieser Test wurde von Gesteland (1966) zum Screening von RNase$^{(-)}$-Mutanten bei E.coli entwickelt.

Physarum RSD_4-Amöben haben zwei RNase-Isoenzyme mit isoelektrischen Punkten im sauren und nahezu neutralen Bereich (Brand, 1974). Wenn eines dieser Isoenzyme oder beide durch eine Mutation ausfallen, sollte sich dieses Fehlen in einem erheblich verminderten Abbau der RNA gegenüber Wildtypzellen bemerkbar machen, die im Test zu finden sein sollten. Es konnte jedoch in allen 300 untersuchten Klonen aktive RNase festgestellt werden. Als Kontrolle diente dabei der unter gleichen Bedingungen getestete Wildtyp.

Einige der mutagenisierten Klone zeigten ein wesentlich langsameres Wachstum als die übrigen. Da bei diesen Zellen ein Enzymmangel am ehesten vermutet werden konnte, wurden sie nach längerer Inkubationszeit (bis zu einer Woche) gesondert

getestet, bis eine Mutation in Bezug auf RNase völlig ausgeschlossen werden konnte.

3.1.3. Test auf DNase$^{(-)}$-Mutanten

Obwohl bei RSD_4-Amöben noch keine genauen biochemischen Daten über DNase- und Phosphatase-Isoenzyme vorlagen, wurde versucht, die 300 Klone auch auf einen Mangel an diesen Enyzmen zu testen. Dies bot sich im Hinblick auf das Ziel der Arbeit insofern an, als auch von diesen beiden Enzymaktivitäten eine regulative Funktion bei der Differenzierung der Plasmodien zu Sklerotien vermutet werden konnte: Die DNA nimmt während der Sklerotienbildung um etwa 40% ab (Sauer et al., 1970) und auch im Phosphatstoffwechsel erfolgen erhebliche Umschichtungen (Goodman et al., 1969).

Es zeigte sich, daß die Verwendung des RNase-Testes (Gesteland, 1966) zum Nachweis von DNase-Mutanten nicht möglich war. Durch entsprechende Veränderungen der Bedingungen (vgl. Tab. 3) konnte jedoch ein zufriedenstellender Test erreicht werden. Es wurde allerdings keine DNase-Mangelmutante gefunden.

3.1.4. Test auf Phosphatase$^{(-)}$-Mutanten

Es wurden zwei verschiedene Tests versucht:

a) Für die erste Methode diente als Grundlage der von Ortiz (1973) für Exo-ß-N-Acetylglucosaminidaseaktivität bei Bacillus subtilis ausgearbeitete Test. Als Substrat wurde dazu 4-Methyl-umbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy-ß-D-glucopyranosid verwendet, das vom Wildtyp in fluoreszierendes 4-Methylumbelliferon gespalten wurde.
Entsprechend wurde für den Phosphatase-Test 4-Methyl-umbelliferyl-phosphat als Substrat eingesetzt. Diese Methode hat den Vorteil, daß sie ein Screening bei lebenden Amöben ermöglicht hätte. Sie fiel in diesem Fall deshalb als Untersuchungsmöglichkeit aus, weil der als Futter ver-

wendete Bakterienrasen durch eine noch vorhandene Phosphataseaktivität bei 336 nm ebenfalls Fluoreszenz hervorrief.

b) Aus diesem Grunde wurde eine weitere Methode getestet, mit der Messer und Vielmetter (1965) verschiedene auxotrophe Mutanten bei E.coli und Bacillus subtilis isolierten: durch Inkubieren mit α-Naphthyl-phosphat und Kuppeln des entstandenen α-Naphthol mit einem Azofarbstoff. Dieser Test wurde für Amöben in etwas abgewandelter Form übernommen (vgl. Tab. 3).
Alle Wildtypkolonien zeigten schon nach 2 h Inkubation an den Rändern den braunrot gefärbten Azofarbstoff. Dieselbe Reaktion wurde allerdings auch bei allen getesteten mutagenisierten Klonen beobachtet.

3.1.5. Test auf Alaninaminopeptidase$^{(-)}$-Mutanten

In Plasmodien wurde dieses Enzym bereits biochemisch charakterisiert: Hoffmann (1975) fand mit dem Enzymtest nach Erlanger in Plasmodien eine Alanin- und drei Leucinaminopeptidase-Banden mit einem pH-Optimum gegenüber den entsprechenden Nitroaniliden bei pH 8.0. Ein Versuch, das gleiche Substrat in den histochemischen Enzymtest einzusetzen, scheiterte an dem Vorhandensein einer Restaktivität von Aminopeptidase in den E.coli-Futterbakterien: Die Oberfläche des Agars war nach der Inkubation mit Alanin-4-nitroanilid gleichmäßig gelb gefärbt. Zwar konnte dieser Effekt durch Erhitzen der Bakteriensuspension aufgehoben werden, aber das Substrat erwies sich trotzdem als ungeeignet, weil der Wildtyp nunmehr gar keine Färbung aufwies. Möglicherweise konnte dieses Enzym mit dem verwendeten Detergens nicht freigesetzt werden. Deshalb wurden außerdem noch die Detergentien Brij 35 und 58 sowie Triton X-100 in Konzentrationen von 0,15 -0,3% getestet, aber auch kein reproduzierbares Ergebnis erzielt.

Aus diesem Grund wurde der empfindlichere Test mit Alanin-

naphthylamid als Substrat eingesetzt und das entstandene α-Naphthol mit den unter Tab. 3 aufgeführten Diazoniumsalzen gekuppelt. Da diese Salze bei pH 8.0 einen stark hemmenden Effekt auf die Aminopeptidase ausüben (Nachlas et al., 1957), wurde ihre Konzentration so weit wie möglich herabgesetzt. Mit Fast-Garnet GBC als Kupplungs-Salz konnte für Leucinaminopeptidase ein gutes, für Alaninaminopeptidase jedoch kein reproduzierbares Ergebnis erzielt werden: Die Kulturränder färbten sich gar nicht oder sehr gering.

Da aber für Leucinaminopeptidase in Amöben vier Isoenzyme existieren, erschien ein Screening dieses Enzyms nicht lohnend. Daß mit diesen klassischen, bei anderen Organismen bewährten Methoden für Physarum Amöben keine Enzymmangel-Mutante gefunden wurde, mag folgende Gründe haben:

1. Die interessierenden Enzyme sind anscheinend lebensnotwendig für den Organismus. Ein Fehlen würde daher einen Letalfaktor darstellen. In diesem Fall müßte nach Mutanten gesucht werden, bei denen das entsprechende Enzym nur unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei erhöhter Temperatur, inaktiviert ist, sonst aber normal funktionstüchtig bleibt (= konditionelle, temperatur-sensitive Enzymmangel-Mutanten). Ein Screening dieser konditionellen Mutanten ist allerdings nur im flüssigen Medium möglich, da der Agar für das entsprechende Protein ein Schutzkolloid darstellen würde, so daß eine teilweise erfolgende Denaturierung durch die erhöhte Temperatur unterbliebe.

2. Möglicherweise ist die Mutagenitätsrate für Enzymmangel-Mutanten so gering, daß zu wenig Klone getestet wurden. Da aber das Herstellen und Testen von 300 Plaque-size-Mutanten bereits ein Jahr erforderte, ist eine Handhabung in größeren Zahlen nicht durchführbar.

Insgesamt zeigte sich, daß ein erfolgreiches Screening erst nach der Gewinnung weiterer, wichtiger biochemischer Daten möglich ist. Deshalb war es erforderlich, Methoden auszuarbeiten, die eine reproduzierbare Anzucht von Amöben in axenischer Flüssigkeitskultur ermöglichen, um dann genügend Material für diese notwendigen biochemischen Untersuchungen zur Verfügung zu haben.

3.2. Ausarbeitung eines axenischen Flüssigkeitsmediums für RSD_4-Amöben

Goodman (1972) hat erstmalig ein sehr komplexes axenisches Medium für die Anzucht von Amöben publiziert. Außerdem erhielten wir von der Arbeitsgruppe Dr. Dee (Leicester) zwei weitere, noch unveröffentlichte, einfachere Ausarbeitungen (SM3 und DM1).
Mit keinem dieser Medien konnte jedoch auf Anhieb ein befriedigendes Zellwachstum erreicht werden; die Amöben vermehrten sich überhaupt nicht oder starben bereits nach wenigen Transfers ab. Dieser Mißerfolg konnte die unterschiedlichsten Gründe haben: z.B. Adaptationsschwierigkeiten der von Platten geernteten Amöben an das flüssige Medium, unterschiedlicher Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien, unterschiedliche Fe^{++}-Konzentration in den einzelnen Vorschriften.

Daher wurden die Kulturbedingungen in vielen Versuchsreihen variiert:
Um eine Adaptation der Amöben an ein flüssiges Medium zu erleichtern, wurden sie zunächst in ein bakterienhaltiges Übergangsmedium (HB) übergeimpft.
Da eine spezifische Hemmung des Zellwachstums bei "Platten"-Amöben durch erhöhte Fe^{++}-Konzentrationen beobachtet wurde (Holt und Dee, unveröffentlicht), wurden verschiedene Eisensalze in Konzentrationen von 15 mg/l bis herab 0,0097 mg/l in allen Medien getestet.

Die in drei Medien enthaltene Stickstoffkomponente Serumalbumin vom Rind (RSA) kann außer der Viskositätseinstellung noch unbekannte Einflüsse auf das Wachstum haben (evtl. Absorption von toxischen Metaboliten und Carrierfunktion, Goodman, 1972). Deshalb wurden die RSA-Konzentrationen in den Medien SM3, DM1 und HS von 1 - 5 % variiert.

Außerdem wurden noch folgende Außenbedingungen verändert: Die verschiedenen Salzmedien wurden gegeneinander ausgetauscht, die Inkubation bei Temperaturen von 22 - 28° C und unterschiedlicher Belüftung (20 - 100 Upm) getestet. Bei diesen Untersuchungen wurde immer ein starkes Zusammenballen der Amöben beobachtet, welches das Auszählen im Haemazytometer sehr erschwerte.
Bei Umdrehungszahlen des Schüttlers über 100 Upm konnte dieser Effekt zwar vermindert werden, in diesem Fall hafteten die Amöben jedoch verstärkt an der Glaswand und zudem wurden die Zellen zum großen Teil geschädigt. Eine niedrigere Rotation ließ dagegen keine ausreichende Belüftung zu. So wurde in keinem Fall ein reproduzierbares Wachstum beobachtet.

Deshalb wurde ein anderes axenisches Medium getestet, das eine Vermehrung in "Ruhekultur" (SD) ermöglichen sollte. Auch in diesem Medium konnte anfangs kein Wachstum erzielt werden. Nach diesen vielen Schwierigkeiten und Mißerfolgen erschien es sinnvoll, die Anzucht des so anspruchsvollen Organismus in einem anderen Labor zu erlernen. Die einzige Arbeitsgruppe die routinemäßig und mit Erfolg Amöben anzog, war die um Dr. Dee in Leicester. Da ich bei entsprechenden Versuchen dort sofort im Ruhekulturmedium (SD) und im proteinreichen Medium (SM3) Wachstumsraten von 10^6 - 5 x 10^6 Zellen pro ml innerhalb von drei Tagen erhielt, mußten die in Göttingen beobachteten Schwierigkeiten in den unterschiedlichen Wasserqualitäten liegen. Die in Leicester übergeimpften Kulturen wurden als Stammkulturen nach Göttingen gebracht und dort in SD und SM3-Medien mit verschiedenen Wasserqualitäten

übergeimpft: demineralisiertes, auf Quarz bidestilliertes und letzteres mit Leitungswasser versetzt. Die Zugabe von 1 - 2% Leitungswasser zum quarz-bidestillierten Wasser brachte Erfolg: Im SD-Medium konnte mit dieser Methode innerhalb von sechs Tagen eine reproduzierbare Vermehrung der Amöben erreicht werden (von 10^6 bis 10^7 Zellen pro ml).

Dieses axenische Medium ermöglichte nun die Anzucht von genügend Amöbenmaterial für biochemische und morphologische Untersuchungen. Mit den so erhaltenen Zellsuspensionen wurden parallel einleitende Versuche für die Anwendung der von Brenner et al. (1975) zum Mutantenscreening bei Dictyostelium discoideum ausgearbeiteten Technik durchgeführt. Bei diesen Versuchen traten jedoch wiederum einige Schwierigkeiten auf: Einmal war es nicht möglich, die für ein schnelles Replizieren von Klonen notwendige Multipipette zu erhalten, zum anderen stellte sich heraus, daß der nächste Schritt, das Züchten von Einzelklonen im Flüssigkeitsmedium,bei Physarum Amöben nicht möglich war. Mit einem Inokulum von weniger als 5×10^5 Zellen pro ml wurde kein reproduzierbares Wachstum mehr erreicht.

Deshalb wurde der Schwerpunkt der Arbeit auf die für ein Screening auf Mangelmutanten sehr wichtige, biochemische Bearbeitung der erwähnten Enzyme gelegt.

3.3. Biochemische Charakterisierung der Aminopeptidasen, RNasen und Proteasen in axenisch wachsenden Amöben

3.3.1. Isoenzymmuster und Substratspezifität der Aminopeptidasen

Nachdem bereits eine genaue Charakterisierung der Aminopeptidasen in diploiden Plasmodien vorlag (Hoffmann und Hüttermann, 1975), bot sich eine vergleichende Untersuchung derselben Enzyme im haploiden Stadium an.

3.3.1.1. Aminopeptidaseaktivitäten und Sekretion in Abhängigkeit von Wachstum und Kulturbedingungen

In Vorversuchen zeigte sich, daß in Amöben - anders als in Plasmodien - etwa die Hälfte der intrazellularen Aminopeptidaseaktivtät in das Kulturmedium abgegeben wurde. Um festzustellen, ob es sich hier um einen spezifischen Prozeß oder nur um eine Autolyse handelt, wurde der Verlauf der Aktivitätskurve der Enzyme während 12 Tagen Wachstum verfolgt (Abb. 2).
Dazu wurden von 24 Flüssigkeitskulturen mit einer anfänglichen Dichte von 10^6 Zellen pro ml jeden Tag je 2 Kulturen geerntet, abzentrifugiert und der Rohextrakt sowie das entsprechende Medium in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Nach Beendigung des Gesamtversuchs wurden alle Proben aufgetaut und die Enzymtests parallel durchgeführt. Dabei wurde ein Anstieg der intrazellularen Enzymaktivität parallel zur Wachstumskurve der Amöben festgestellt. Mit wachsender Zelldichte wurde auch vermehrt Leucinaminopeptidase in das Medium abgegeben (leichtes Ansteigen der Kurve E). Erst nach etwa 10 Tagen wurde ein zusätzlicher Anstieg der extrazellularen Enzymaktivität beobachtet, der auf eine Autolyse der Zellen in der stationären Wachstumsphase zurückzuführen war.

Bei den vergleichenden Untersuchungen eines proteinarmen (SD, 0,5% Hefeextrakt) und eines proteinreichen (SM3, 3,1% Rinderserumalbumin) Mediums zeigte sich, daß die extrazellulare Aminopeptidaseaktivität unterschiedlich war: Im SD-Medium konnte keine Alaninaminopeptidaseaktivität festgestellt werden (s. Abb. 2), während das proteinreiche SM3-Medium etwa 1/5 der intrazellularen Alaninaminopeptidaseaktivität enthielt. In allen Medien wurde Leucinaminopeptidase gefunden.

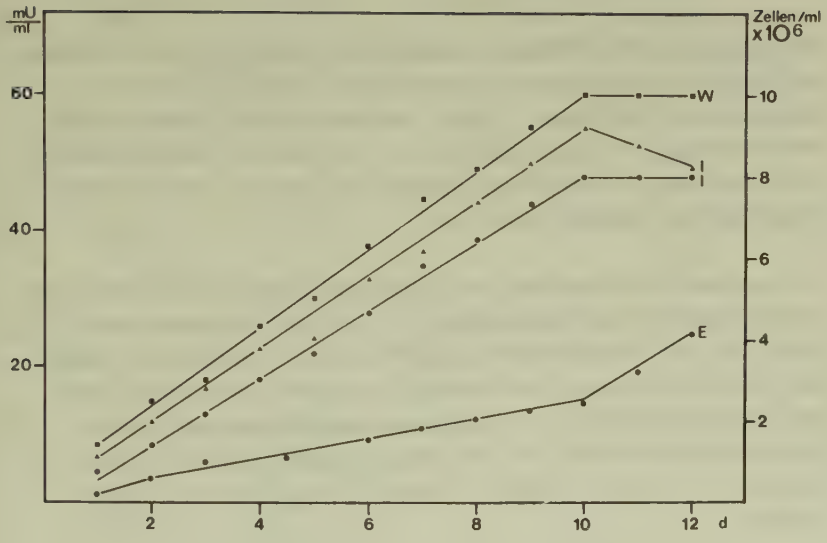


Abb. 2:
Aktivitäten von intra- und extrazellularen Aminopeptidasen von RSD_4-Amöben während des Wachstums innerhalb von 12 Tagen

Substrate: ▲—▲ Ala-NA

●—● Leu-NA

Abkürzungen: I = Intrazellular
E = Extrazellular
W = Wachstumskurve ■—■

3.3.1.2. Untersuchung des Isoenzymmusters durch präparative isoelektrische Fokussierung im Saccharose-Dichtegradienten

Für Physarum RSD_4-Amöben (Anzucht auf Agar) wurde mit dieser Methode Aminopeptidaseaktivität zwischen pH 5.2 und 6.5 festgestellt (Hoffmann, 1975). Vorversuche in einer 10 ml-Fokussiersäule im pH-Bereich 3.5 - 10 bestätigten diese Ergebnisse auch für Aminopeptidasen von Amöben, die im flüssigen Medium gezogen wurden.

Eine genaue Untersuchung des Isoenzymmusters wachsender Amöben im gespreizten pH-Bereich 5 - 7 ergab folgendes Bild (Abb. 3): Für das Substrat Ala-NA wurde eine scharfe Bande, für Leu-NA insgesamt vier Banden gefunden, von denen sich die erste genau mit der Alaninaminopeptidasebande deckte. Es scheint sich somit um das gleiche Isoenzym zu handeln, das zu Leu-NA eine weniger große Affinität als zu Ala-NA besitzt.

Bei der Fokussierung der Medien ergaben sich für das proteinarme und proteinreiche Medium unterschiedliche Enzymmuster (Abb. 4 und 5).
Im proteinarmen SD-Medium fehlte die Ala-Bande, während im proteinreichen SM3-Medium jeweils für Leu- und Ala-NA die gleichen vier Isoenzyme gefunden wurden. In diesem Fall mußte der Enzymtest wegen des hohen Proteingehalts im Medium geändert werden; beim Abstoppen mit Dimethylformamid fiel ein Teil des Proteins aus, der durch Abzentrifugieren entfernt wurde.

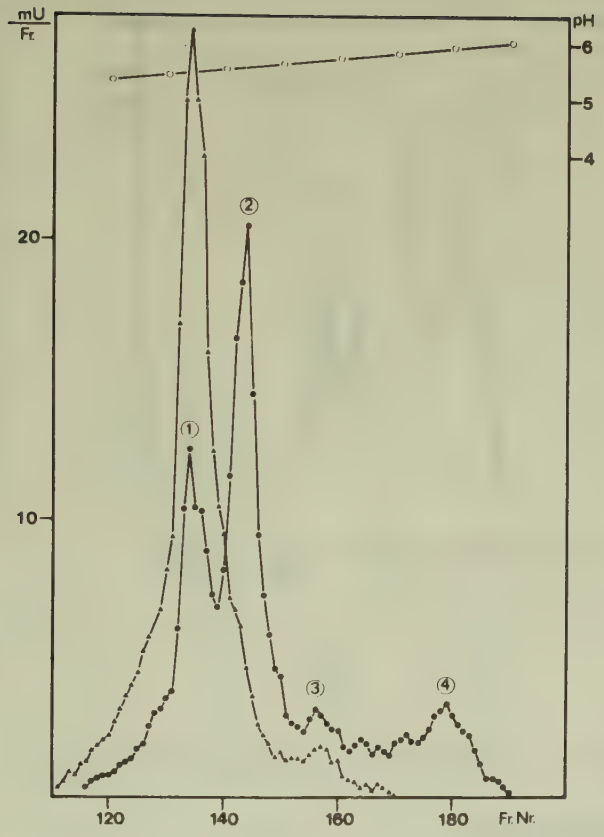


Abb. 3:
Isoenzymmuster der Alanin- und Leucinaminopeptidase in wachsenden Amöben.

Substrate: ▲—▲ Ala-NA

●—● Leu-NA

pH-Gradient: ○—○

Isoelektrische Punkte: 1 : pH 5.5 3 : pH 5.7

2 : pH 5.6 4 : pH 5.95

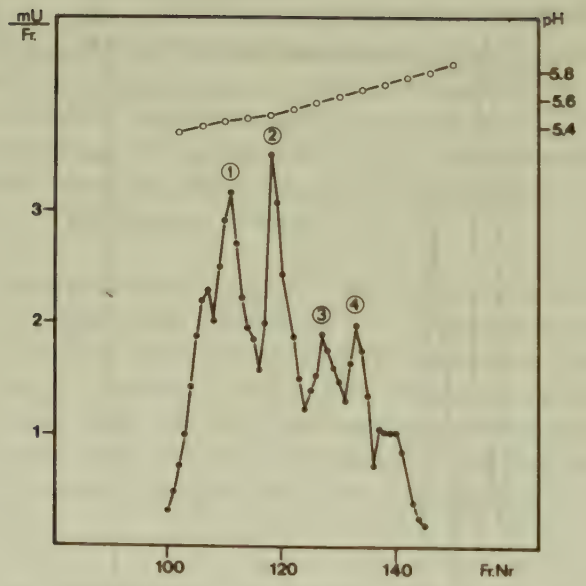


Abb. 4:
Isoenzymmuster der Leucinaminopeptidase im SD-Medium

Isoelektrische Punkte: 1 : pH 5.44 3 : pH 5.6
2 : pH 5.48 4 : pH 5.66

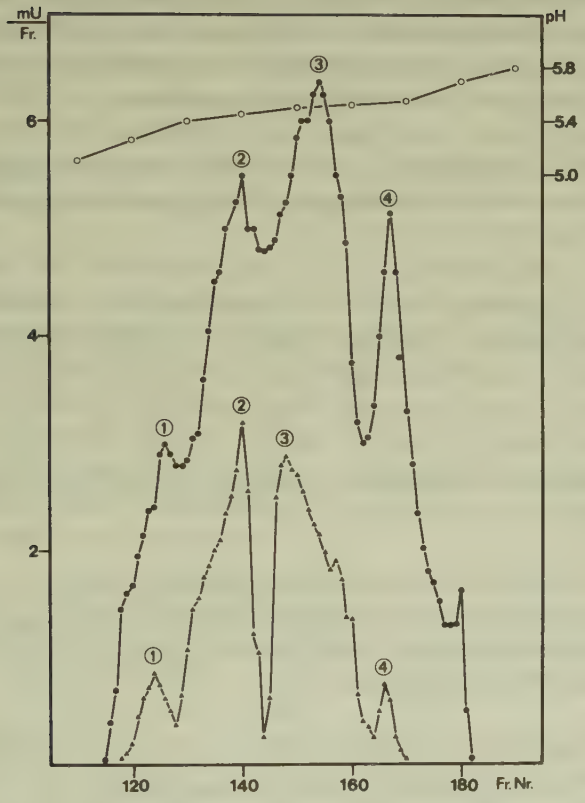


Abb. 5:
Isoenzymmuster der Alanin- und Leucinaminopeptidase im SM3-Medium

Substrate: ▲—▲ Ala-NA
●—● Leu-NA

pH-Gradient: ○—○

Isoelektrische Punkte: 1 : pH 5.37 3 : pH 5.45
2 : pH 5.43 4 : pH 5.57

3.3.1.3. Substratspezifität der Isoenzyme

Um die gefundenen Isoenzyme näher zu charakterisieren, wurden nach einer isoelektrischen Fokussierung die vereinigten Fraktionen eines jeden Isoenzyms auf ihre Substratspezifität gegenüber anderen Nitroanilidderivaten getestet.

Tab. 7: Relative Aktivitäten (%) der drei Hauptisoenzymbanden gegenüber verschiedenen NA-Derivaten bezogen auf Leu-NA (100%)

Bande	Gly-NA	Lys-NA	Phe-NA	Pro-NA	Tyr-NA	Ala-NA
1	1,3(13)	54(70)	80(50)	27(25)	93(170)	209(331)
2	0,1(2)	5(9)	121(160)	21(22)	82(200)	45(40)
3	0 (0)	3(3)	170(50)	24(20)	106(170)	0(18)

Die von Hoffmann für Plasmodien gefundenen Werte sind in Klammern angegeben.

Ein Vergleich mit den für Plasmodien gefundenen Werten zeigt, daß sich die entsprechenden Isoenzymbanden der diploiden und haploiden Phase hinsichtlich ihrer Substratspezifitäten nur leicht voneinander unterscheiden.

Um festzustellen, ob die Hydrolyse dieser Substrate tatsächlich auf eine Exopeptidaseaktivität zurückzuführen ist, wurden die Extrakte mit N-Acetyl-alanin-nitroanilid inkubiert, das gewöhnlich als Substrat für die Endopeptidasen Trypsin, Chymotrypsin und Papain verwendet wird. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hoffmann und Hüttermann (1975) wurde festgestellt, daß dieses N-substituierte Derivat von keinem der Isoenzyme gespalten wurde.

Zur Beurteilung der Bedeutung der Aminopeptidasen im Zellstoffwechsel ist es von Interesse, ob sich diese Enzyme gegenüber natürlichen Substraten, z.B. Dipeptiden, genauso

verhalten wie gegenüber den künstlichen. Zur Klärung dieser Frage wurde der aus wachsenden Amöben gewonnene Enzymextrakt mit einer Reihe von Dipeptiden inkubiert und die Reaktionsprodukte in einer Hochspannungselektrophorese untersucht. Die Anfärbung der Chromatogramme ergab für alle mit Enzymextrakt inkubierten Dipeptide drei violett gefärbte Flecke: ein Rest ungespaltenes Dipeptid und die durch Enzymspaltung daraus entstandenen beiden Aminosäuren. In dieser Weise wurden alle getesteten Dipeptide vom Enzym gespalten.

Da die Inkubation bei pH 8 durchgeführt wurde, konnte eine Spaltung durch unspezifische Proteasen, die ebenfalls mit diesen Substraten reagieren würden, ausgeschlossen werden, da diese Enzyme in dem gewählten pH-Bereich inaktiv sind (Nuske, unveröffentlicht). Um eine Aktivität von Carboxypeptidase völlig auszuschalten, wurde außerdem eine Hochspannungselektrophorese mit substituierten Dipeptiden (CBZ-Derivaten) durchgeführt. Diese Substrate wurden erwartungsgemäß nicht gespalten.

Aus obigen Ergebnissen läßt sich abschätzen, daß die Abbauraten von den Nitroanilidderivaten größenordnungsmäßig durchaus mit denen von Dipeptiden übereinstimmen.

Nachdem es nun mit dieser Methode gelungen war, die Aminopeptidaseaktivität im Rohextrakt gegenüber natürlichen Substraten zu verfolgen, wäre es wünschenswert gewesen, die Banden der isoelektrischen Fokussierung und die beiden Medien ebenfalss in den Test einzusetzen, um die Aktivität der Isoenzyme gegenüber den Nitroanilidderivaten mit der gegenüber Dipeptiden zu vergleichen. Dabei ergaben sich jedoch erhebliche Schwierigkeiten:

1. Die in den Medien vorhandenen Aminosäuren mußten entfernt werden, da sie bei der Hochspannungselektrophorese stören würden. Eine Dialyse des Mediums ergab je-

doch, daß das Enzym während dieser Prozedur inaktiviert wurde. Gelfiltration über Sephadex G-25 und anschließende Konzentrierung des Proteins über Polyaethylenglycol führte ebenfalls zum Verlust der Enzymaktivität.

2. Bei den Banden der isoelektrischen Fokussierung ergaben sich ähnliche Probleme: Die in der Hochspannungselektrophorese störenden Ampholine konnten nicht ohne einen Aktivitätsverlust von dem Enzym abgetrennt werden.

3.3.2. Isoenzymmuster und Substratspezifität der RNasen

Auch diese Enzyme wurden in Plasmodien bereits näher charakterisiert (Brand, 1974), so daß ein Vergleich mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen möglich war.

3.3.2.1. Untersuchung des Isoenzymmusters durch präparative isoelektrische Fokussierung im Saccharose-Dichtegradienten

Übereinstimmend mit den Daten von Brand (1974) wurden für RSD_4-Amöben zwei Isoenzyme mit isoelektrischen Punkten im stark sauren und nahezu neutralen Bereich gefunden (Abb. 6). Gegenüber den auf Platten gezogenen Amöben waren die Banden der im flüssigen Medium wachsenden Amöben etwas mehr in den sauren Bereich verschoben:

p.I. (1) 5.9 p.I. (2) 3.3

Das Aktivitätsoptimum für die neutrale Bande lag bei pH 5.0 (Abb. 7), für die saure bei pH 3.7 (Brand, 1974).
Im SD-Medium wurde das gleiche Bandenmuster wie in Amöben erhalten, allerdings war die Aktivität des extrazellularen Enzyms - anders als in Plasmodien - nur etwa halb so hoch wie die des intrazellularen (Abb. 8). Bei der Fokussierung von SM3-Medium störte der hohe Albumingehalt die Ausbildung eines linearen Gradienten. Bei pH 6.0 entstand ein Plateau, da das Isoenzym den gleichen isoelektrischen Punkt wie Rinderserumalbumin hat. Deshalb konnte sich keine scharfe Bande in

diesem Bereich bilden.
Trotzdem war aus diesen Ergebnissen ersichtlich, daß die Isoenzymmuster beider Medien mit dem in Amöben identisch waren.

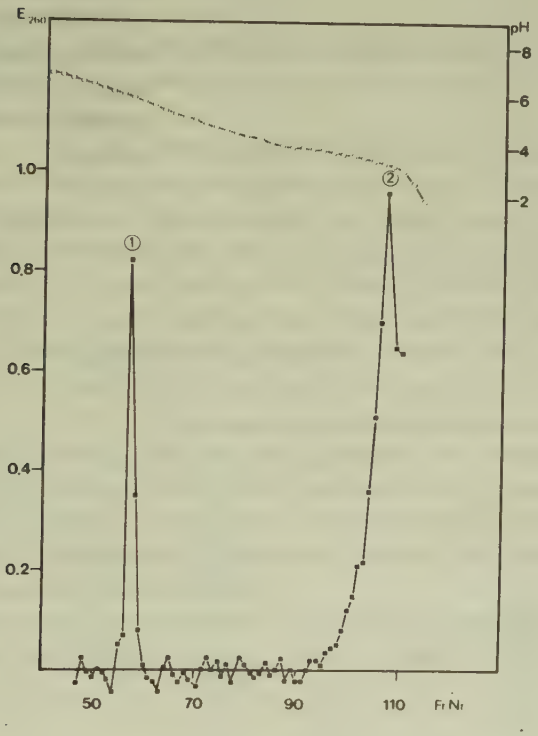


Abb. 6:
Isoenzymmuster der RNasen in wachsenden Amöben.
Die im pH-Bereich unterhalb von 3.0 liegenden geringen RNase-Aktivitäten sind teilweise auf eine Säurehydrolyse zurückzuführen (Übergang des Gradienten in die Anodenflüssigkeit) und wurden daher bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

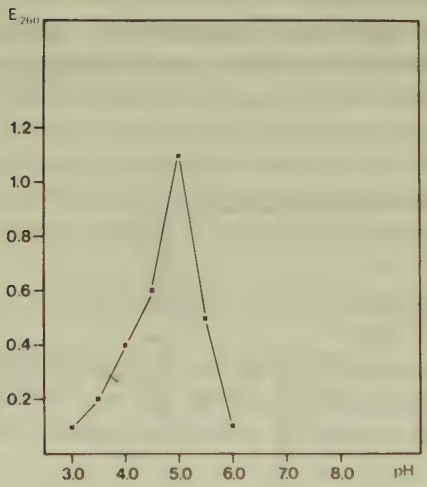


Abb. 7:
RNase-Isoenzym 1:
pH-Optimum gegenüber niedermolekularer RNA aus Hefe als Substrat in Citronensäurephosphatpuffer

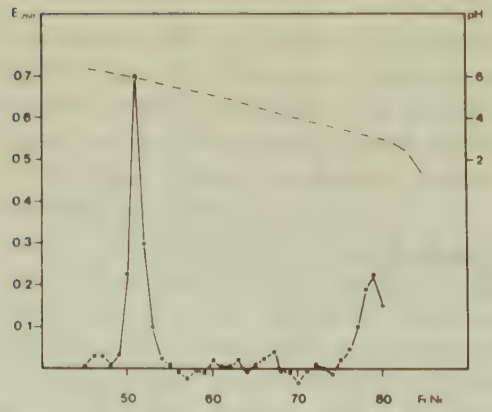


Abb. 8:
Isoenzymmuster der extrazellularen RNasen im SD-Medium.
Isoelektrische Punkte:
1 : pH 5.9 2 : pH 3.1

3.3.2.2. Substratspezifität der Isoenzyme

Zur Ermittlung der Substratspezifität der RNase-Banden wurden die jeweiligen Peakfraktionen einer isoelektrischen Fokussierung mit einer Reihe von Dinucleotiden inkubiert und die Reaktionsprodukte in einer Hochspannungselektrophorese untersucht.
Außerdem wurde die Aktivität der Banden gegenüber Polynucleotiden, DNA, "core"-RNA (Hilmoe, 1960) und bis-Nitrophenylphosphat getestet.
In Tab. 8 sind die Substratspezifitäten der beiden Isoenzyme gegenüber den oben genannten Substraten aufgeführt.
Die beiden Banden unterscheiden sich qualitativ in ihrer Aktivität gegenüber ApA, GpC und Poly-A. Da bei Poly-A im pH-Bereich 3 - 4 möglicherweise sterische Behinderungen auftreten können, wurde Bande 1 auch bei pH 5.0 getestet, aber ebenfalls keine Aktivität gefunden, obwohl lösliche RNA aus Hefe bei gleichem pH vom Enzym gespalten wird.

Um sicher zu sein, daß bei der Spaltung der Dinucleotide nicht auch eine unspezifische Nuclease oder Phosphodiesterase eine Rolle spielt, wurden die isolierten Banden mit DNA und bis-Nitrophenylphosphat inkubiert, jedoch in keinem Fall eine Hydrolyse festgestellt.
Eigenartigerweise waren die beiden RNasen gegenüber kurzkettiger "core"-RNA (Hilmoe, 1960) ebenfalls aktiv.

Tab. 8: Substratspezifität der RNase-Isoenzyme
+ : Spaltung - : keine Spaltung
Wenn nichts anderes angegeben, wurden 3'→ 5'-Dinucleotide verwendet.

	Bande i.P. 3.1	Bande i.P. 6.0
a) Dinucleotide		
ApA	+	-
ApC	+	+
ApU	-	-
CpC	-	-
CpG	-	-
GpC	+	-
GpC (2'→5')	-	-
GpU	+	+
UpA	+	+
UpC	+	+
UpG	+	+
UpU	+	+
b) Polynucleotide		
poly-A	-	+
poly-C	-	-
poly-G	-	-
poly-U	+	+
c) weitere Substrate		
DNA	-	-
bis-Nitro-phenyl-phosphat	-	-
"core"-RNA	+	+

3.3.3. Isoenzymmuster der intra- und extrazellularen Proteasen

Im Kulturmedium von Physarum Plasmodien wurden 3 Proteasen gefunden, von denen eine, die "Rennin-ähnliche", näher charakterisiert wurde (Farr et al., 1974). Ebenso deuten die großen Mengen an Aminosäuren, die nur in gebrauchtem, nicht aber in frischem SM3-Medium gefunden wurden, auf eine extrazellulare Proteaseaktivität hin (McCullough, unveröffentlicht).

Von diesen Ergebnissen ausgehend wurde mit Hilfe der präparativen isoelektrischen Fokussierung versucht, die Isoenzyme in Enzymextrakten von Amöben und in den Medien aufzutrennen.
Intrazellular wurde in wachsenden Kulturen folgendes Isoenzymmuster gefunden (Abb. 9).
Von diesen vier Banden konnte im SD-Medium nur das Isoenzym mit dem isoelektrischen Punkt bei pH 3.6 nachgewiesen werden (Abb. 10). Im proteinreichen SM3-Medium wurde mit dieser Methode keine Protease-Aktivität festgestellt.

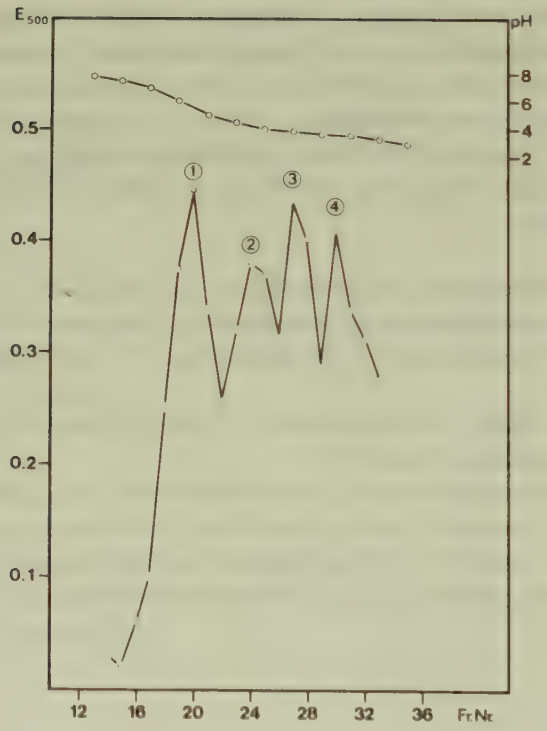


Abb. 9:
Isoenzymmuster der Proteasen in wachsenden Amöben
Isoelektrische Punkte:

1 : pH 5.5
2 : pH 4.2
3 : pH 3.8
4 : pH 3.6

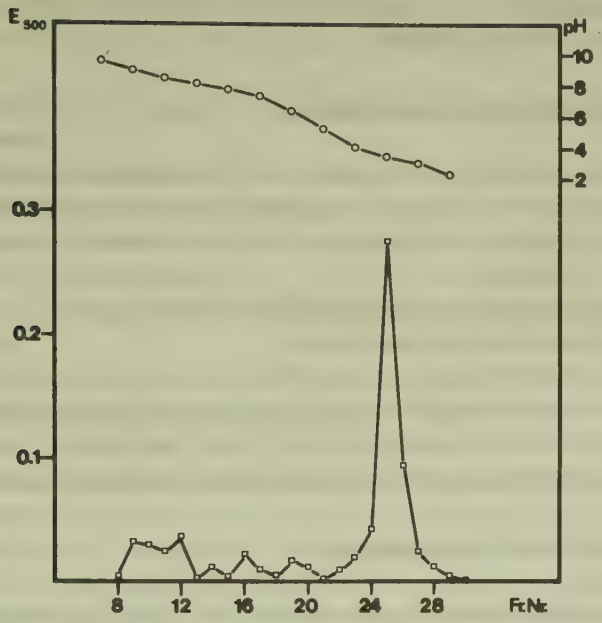


Abb. 10:
Isoenzymmuster der extrazellularen Protease im SD-Medium

3.4. Strukturelle und ultrastrukturelle Veränderungen während der Differenzierung

Da für Plasmodien eine Änderung des Isoenzymmusters während der Differenzierung zu Spherulen gefunden wurde, war es nun von großem Interesse, die Aktivitäten der untersuchten Enzyme auch während der Enzystierung von Amöben zu verfolgen, um somit einen Vergleich zur Sklerotienbildung zu haben und die Enzymausstattung während des gesamten Generationswechsels im Hinblick auf eine mögliche genetische Regulation sowie ein mögliches Screening zu erfassen.

Dazu mußte zunächst eine reproduzierbare Induktion der Zystenbildung erreicht werden.

3.4.1. Induktion der Zystenbildung

Bei Plasmodien erfolgt der Übergang zu Sklerotien allmählich in einer überalterten Kultur. In einer 30 Tage alten Flüssigkeitskultur von Amöben war dagegen nur ein geringer Prozentsatz (ca. 5%) enzystiert.
Zur präzisen, zeitlich reproduzierbaren Induktion der Sklerotienbildung gibt es zwei Wege:

1. Induktion durch Hunger (Jump, 1954, Daniel und Baldwin, 1964),
2. Induktion durch Transfer in ein synthetisches Wachstumsmedium, das 0,5 M Mannit enthält (Chet und Rusch, 1969).

Diese beiden Methoden wurden auf Physarum Amöben übertragen.

3.4.1.1. Induktion durch Hunger

24 h nach dem Übersetzen in ein nährstoff-freies Salzmedium (BSS: enthält die Salze des SD-Mediums, pH 4.0, vgl. Tab. 1) wurde für kurze Zeit das vermehrte Auftreten von Schwarmzellen beobachtet; Zysten wurden jedoch nicht gebildet. Innerhalb einer Woche verringerten die Amöben ihre Größe ständig und bildeten Zellansammlungen von mehreren 100 Zellen, die sich auch durch längeres Schütteln nicht auflösen ließen. Derart gehungerte Zellen entwickelten sich in frischem SD-Medium nach einer lag-Phase von einigen Tagen wieder zu ihrer normalen Größe und teilten sich dann normal weiter. In diesem Hungermedium konnte selbst nach 14 Tagen noch keine reproduzierbare Induktion von echten Zysten erzielt werden.

Bei Amöben auf Agarkulturen besteht offenbar eine größere Bereitschaft zur Zystenbildung (vgl. Abschnitt 2.2.1. b). Auch ist die Keimfähigkeit der so erhaltenen Zysten erhöht, wenn eine vitaminhaltige Komponente (e.g. Hefeextrakt) angeboten wird (Haugli und Hüttermann, unveröffentlicht). Deshalb

lag es nahe, die Bildung von Zysten im flüssigen Medium ebenfalls durch Vitaminzugabe zu verbessern.

Es wurden also jeweils folgende vitaminhaltige Substanzen zugesetzt:

0,25 % Hefeextrakt (1)
0,25 % Kaseinhydrolysat (2)
0,25 % (1) und (2) pH 4.3 - 4.5
0,25 % Leberinfusion

Mit diesen Zusätzen wurde jedoch keine Zystenbildung erreicht.

3.4.1.2. Induktion durch Mannit

Da durch Hunger offenbar keine mengenmäßig relevante Zysteninduktion erzielt werden konnte, wurde das von Chet und Rusch (1969) entwickelte Mannitsystem getestet. Nach Zugabe von 0,5 M Mannit wurde tatsächlich eine im Phasenkontrastmikroskop zu beobachtende Zysteninduktion nach 24 h festgestellt.
Um die für die Induktion günstige Konzentration zu ermitteln (günstig: möglichst schnelle Induktion bei möglichst geringer physiologischer Schädigung), wurden Amöbensuspensionen der Dichte 10^7 Zellen pro ml mit Mannitkonzentrationen von 0,1 - 1,0 M für 24 h inkubiert und anschließend im Phasenkontrast beobachtet (Abb. 11).
Die günstigste Mannitkonzentration liegt, genau wie bei Plasmodien, bei 0,5 M. Oberhalb dieser Konzentration ist eine geringere Induktion einhergehend mit einer stark ansteigenden Schädigung der Zellen zu beobachten.
Das Auskeimen dieser Zysten erfolgte nach Übersetzen in frisches Medium innerhalb von 30 min.

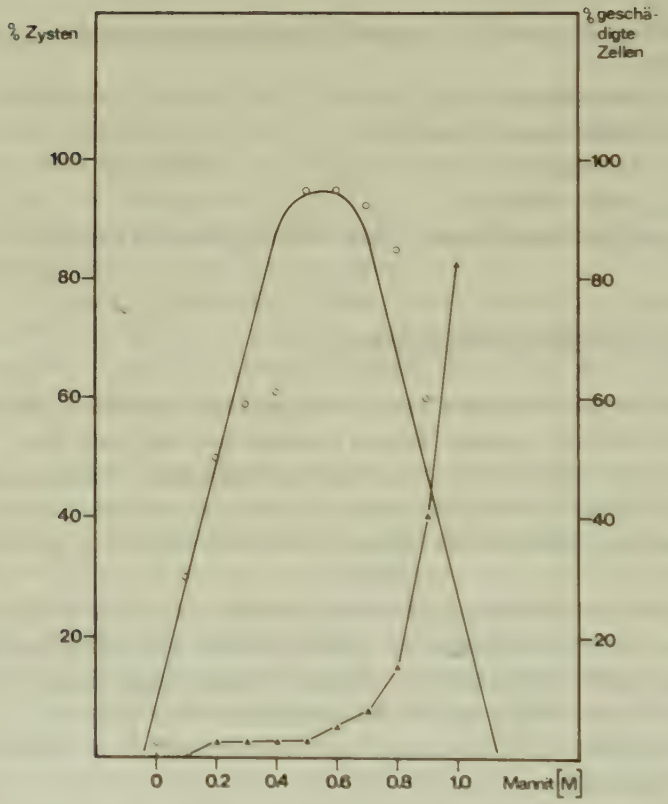


Abb. 11:
Einfluß der Mannit-Konzentration auf den Prozentsatz der Zystenbildung nach 24 h (Beurteilung aufgrund der stärker lichtbrechenden Zystenzellwände im Phasenkontrast)
(O——O) Zysten
(▲——▲) geschädigte Zellen

3.4.1.3. Induktion durch andere Kohlenhydrate

Außer Mannit wurden noch weitere Kohlenhydrate auf ihre Induktionsfähigkeit getestet (Tab. 9).

Tab. 9: Einfluß von verschiedenen Kohlenhydraten auf die Zystenbildung nach 24 h

Kohlenhydrat	% Zysten (Lichtbrechung)	% geschädigte Amöben	% Zysten (Trypan-Blau-Test)
Mannose	82	7	48
Mannit	80	17	45
Fructose	75	15	15
Arabinose	70	16	15
Glucose	70	19	13
Sorbit	65	21	15
Galactose	63	18	-
Sorbose	50	8	-
Ribose	37	18	-
Glucosamin	35	50	2
Cellobiose	30	27	-
Glycerin	25	25	-
Lactose	23	12	-
Glycerin-phosphorsäure	0	100	0
Kontrolle	1	1	2

Mannose scheint ein etwas wirksameres Induktionsmittel zu sein, deshalb wurde für die biochemischen Versuche dieser Zucker eingesetzt.
Da bei der Beurteilung der Zysteninduktion allein nach den stärker lichtbrechenden Zellwänden die Streuung der Werte relativ hoch war (bis zu 15%), wurde ein spezifischerer Test

zur Unterscheidung von Amöben und Zysten entwickelt. Durch Zugabe von 0,025% Cemulsol NPT 12 und 0,2% Trypan-Blau konnten die Amöben aufgrund ihrer Violettfärbung von den hellgelben Zysten unterschieden werden.
Mit diesem Test konnte nur noch eine geringere Induktionsfähigkeit von Mannose und den anderen getesteten Kohlenhydraten festgestellt werden (Abb. 12, vgl. Tab. 9).

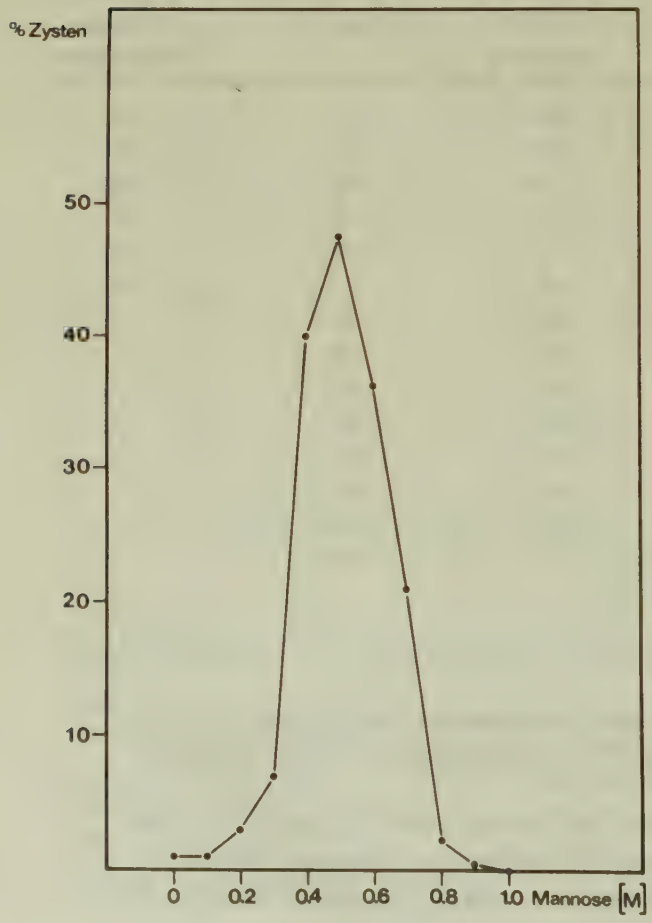


Abb. 12: Einfluß der Mannose-Konzentration auf den Prozentsatz der Zystenbildung nach 24 h (Beurteilung nach dem Trypan-Blau Test)

Außerdem konnte im Trypan-Blau Test ein Unterschied zwischen der Induktion im nährstoff-freien und nährstoff-haltigen Medium festgestellt werden: Gab man zu einer SD-Kultur Detergens und Farbstoff zu, so lysierten die Zellen nach einer kurzen Anfärbungsphase (30 - 60 sec) sofort, was das Auszählen sehr erschwerte. Wenn man diese Kultur jedoch vorher in Salzmedium (BSS) übersetzte, färbten sich alle Zellen gleichmäßig violett und wurden nicht zerstört. Da das Salzmedium auf die Zystenbildung keinen Einfluß hatte (s.o.) wurde immer im BSS induziert.

3.4.1.4. Induktion durch biogene Amine

Um eventuell ein noch wirksameres Zysteninduktionsmittel als Mannose zu finden, wurden auch andere Verbindungen auf ihre Wirksamkeit getestet:
Die Erdamöbe Hartmannella culbertsoni konnte durch biogene Amine wie Taurin und Adrenalin zur Zystenbildung induziert werden (vgl. Krishna Murti, 1971).
Daher wurde das entsprechende Amin dem Standardmedium in einer Endkonzentration von 20 - 40 mM zugesetzt und nach 12 und 24 h beobachtet. Bereits nach 12 h waren nahezu alle Amöben lysiert.

3.4.1.5. Induktion durch Erhöhung des osmotischen Wertes

Eine Induktion, die auf Erhöhung des osmotischen Wertes im Kulturmedium beruht, wurde von Toama und Raper (1967) bei dem zellulären Schleimpilz Polysphondylium pallidum mit KCl durchgeführt.
Bei Amöben konnte mit diesem Salzmedium in Konzentrationen von 0,8 - 1,2 M jedoch keine Zystenbildung erreicht werden.

3.4.1.6. Hemmung der Zysteninduktion

Um mehr über den Wirkungsmechanismus der Induktion zu erfahren,

wurde eine Hemmung mit folgenden Substanzen versucht:

a) Die Induktion der Zysten wurde in Gegenwart von Hemmstoffen der Transskription (Actinomycin C, 300 µg/ml) und der Translation (Cycloheximid, 30 µg/ml) durchgeführt. Keines der beiden Antibiotika hatte einen Hemmeffekt auf die morphogenetischen Prozesse.

b) Bei Physarum Plasmodien konnte eine Hemmung der mit Mannit induzierten Zystenbildung durch aliphatische Alkohole erreicht werden (Kleinig, 1974). Die vier niedrigsten einwertigen Alkohole (Methanol bis Butanol) in einer Konzentration von 0,05 - 0,5% hatten bei Amöben jedoch keinen signifikant hemmenden Effekt auf die Zystenbildung.

3.4.2. Ultrastrukturelle Veränderungen während der Enzystierung

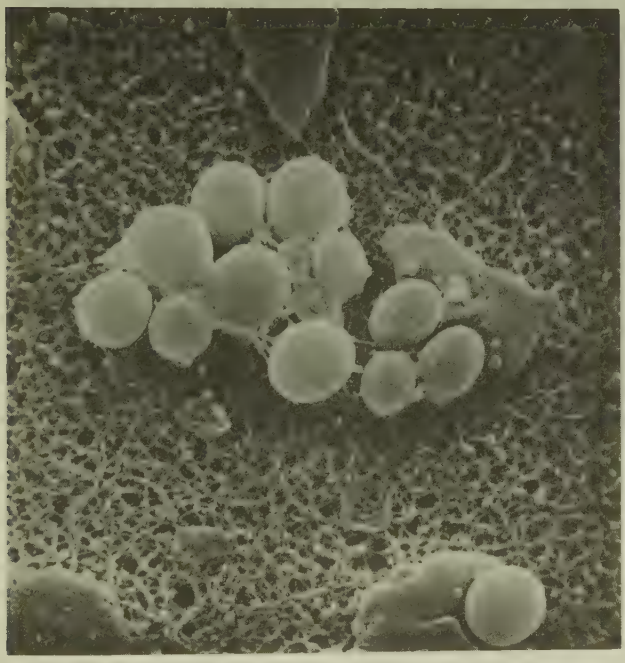
Um festzustellen, ob es sich bei den mannitinduzierten Zysten wirklich um echte oder nur um "Pseudo"-Zysten handelt, wurde ihre Ultrastruktur mit der von Amöben und echten Zysten (Agarkultur) verglichen.

3.4.2.1. Raster-Elektronenmikroskopie

Während der Enzystierung innerhalb einer Kolonie auf einem Bakterienrasen verlieren die Amöben ihre charakteristische Form und Oberflächenstruktur, runden sich allmählich ab und verkleinern ihr Zellvolumen bis eine Kugel von ca. 4 - 5 µm Durchmesser entstanden ist, die Zyste. Abb. 13 - 15 zeigen diesen Vorgang an einem 6 Tage alten Klon, der auf einem Millipore-Filter gezüchtet wurde und in dem natürlicherweise alle Stadien zwischen Amöben (außen) und Zysten (innen) vorkommen.

Da die Mannitinduktion im flüssigen Medium erfolgte, war ein Filtriervorgang erforderlich. Um die dadurch möglicherweise

hervorgerufenen Veränderungen zu erfassen, wurde zur Kontrolle eine auf Agar gezüchtete Kultur ebenfalls über Millipore filtriert (Abb. 16). Außerdem dienten als weiterer Vergleich einige Zysten aus einer 30 Tage alten SD-Flüssigkeitskultur (Abb. 17).



10 /um

Abb. 13:
6 Tage alter Klon, auf Millipore gewachsen

Innen: runde Zysten (hell), Ø ca. 6 /um
Außen: Amöben (dunkel), Länge ca. 13 /um

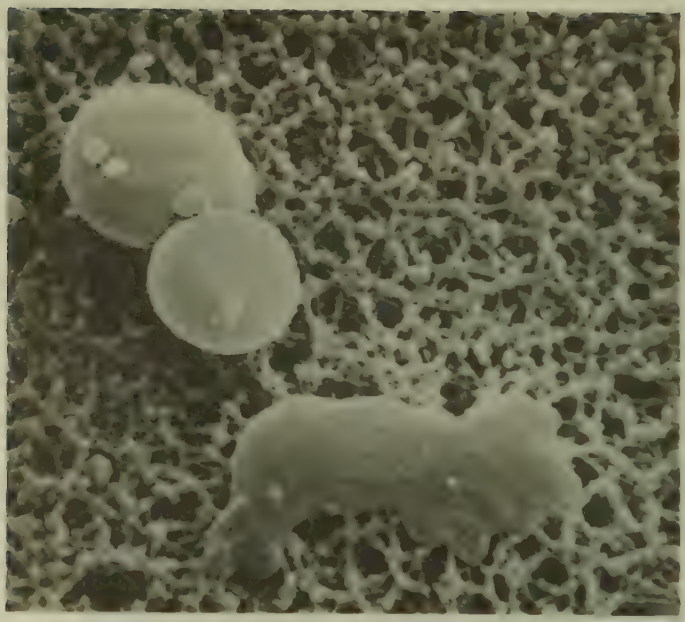
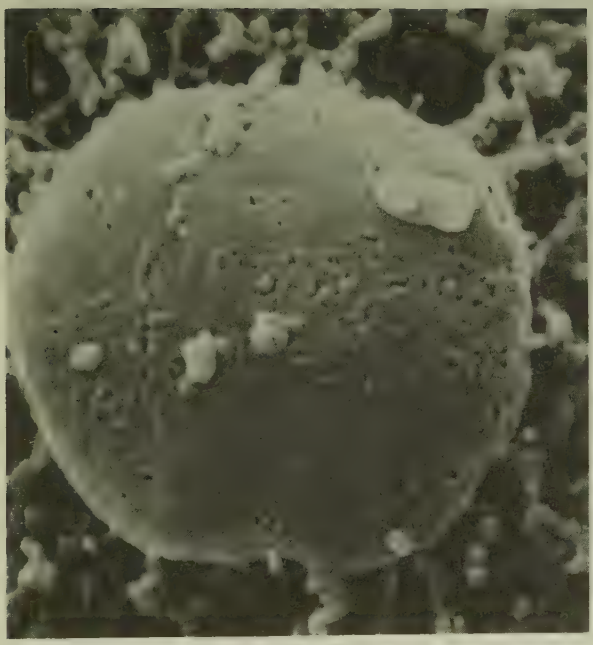


Abb. 14
Ausschnitt aus einem auf Millipore gewachsenen Klon
(6 Tage alt)

Unten ist eine Amöbe mit charakteristischen Pseudopodien zu sehen, links oben zwei Zysten in verschiedenen Reifestadien:
Ø 6 /um: jüngere Zyste
Ø 5 /um: ältere Zyste



1 /um

Abb. 15:
Eine im Übergang zur Zyste befindliche Amöbe aus einem auf Agar gewachsenen Klon (6 Tage)

Die Poren sind noch vorhanden, die Form ist schon sphärisch geworden.
Ø 7 /um

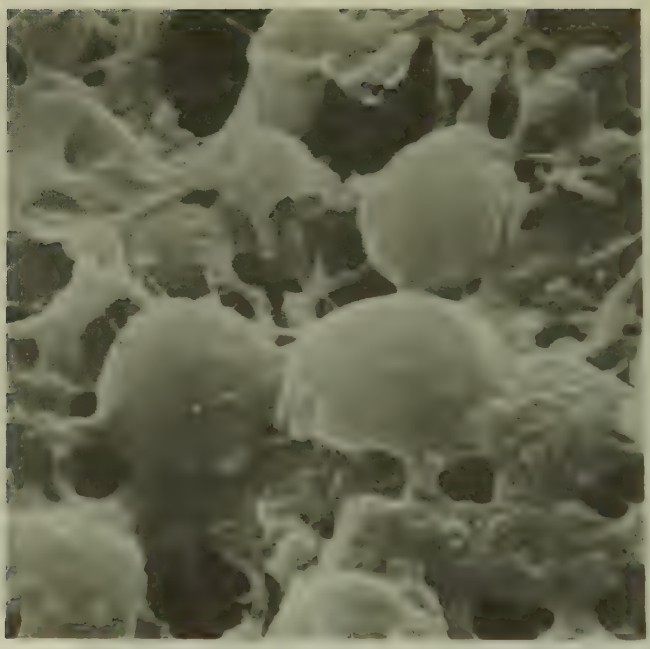


Abb. 16:
30 Tage alte Zysten von der Agarplatte, über Millipore filtriert

Die Poren sind völlig verschwunden. Nebeneinander existieren Zysten mit glatter und runzliger Oberfläche (Ø 4 - 5 /um). Eine unterschiedliche Oberflächenstruktur der Zysten konnte auch schon im Lichtmikroskop festgestellt werden, so daß es sich vermutlich bei den runzligen Zysten nicht um Artefakte handelt.

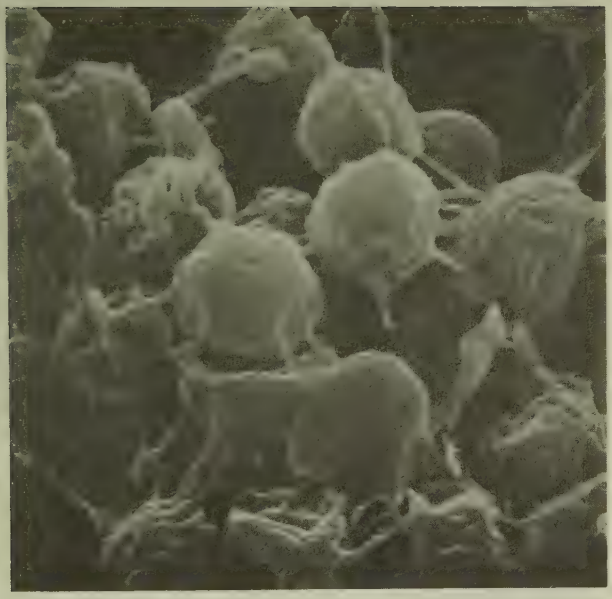
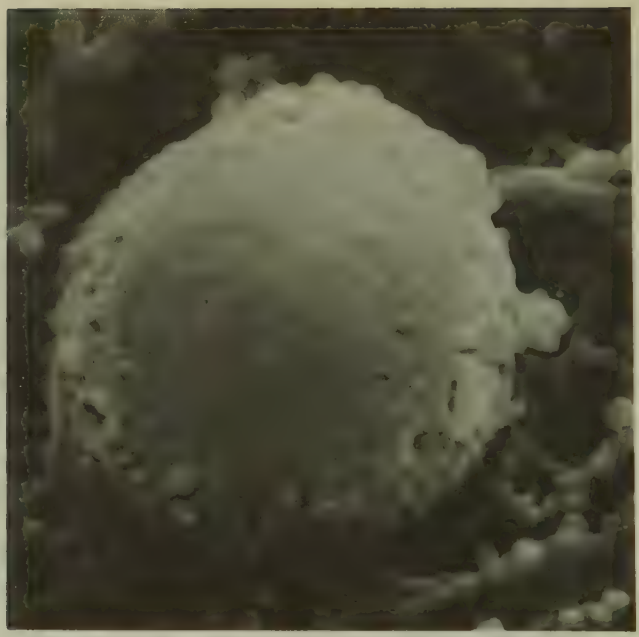


Abb. 17:
Zellen aus einer 30 Tage alten Flüssigkeitskultur (SD)

Die Größe der Zellen und Oberflächenstruktur ähnelt den auf Agar gewachsenen und anschließend filtrierten Zysten sehr.



1 /um

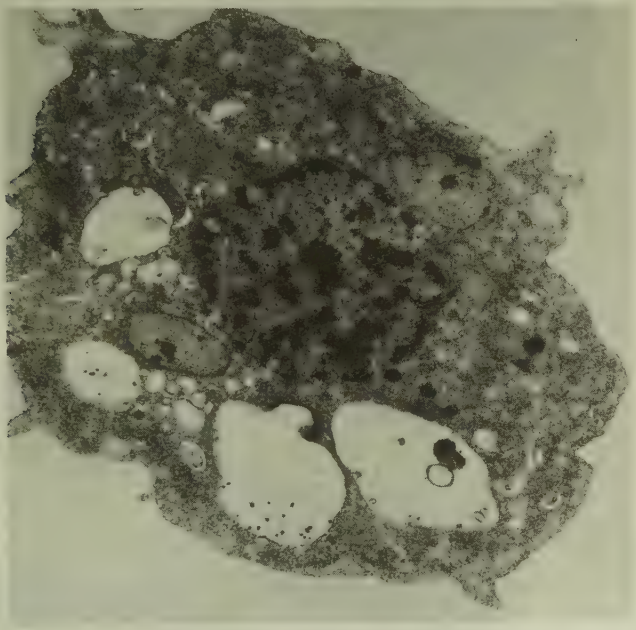
Abb. 18:
Zelle aus einer Flüssigkeitskultur nach 24 h Mannitinduktion

Die Zelle hat eine sphärische Form angenommen, auf der Oberfläche sind vereinzelt Poren sichtbar. Die Größe der Zellen variiert von 4 - 6 /um und entspricht damit einer normalen Zyste.

Der Vergleich aller Bilder zeigt, daß sich nach 24 h Mannitinduktion eine Zelle gebildet hat, die die gleichen Merkmale wie eine junge Zyste (Abb. 15) zeigt: sphärische Form, Ø ca. 5/um und zum Teil noch Poren auf der Oberfläche.

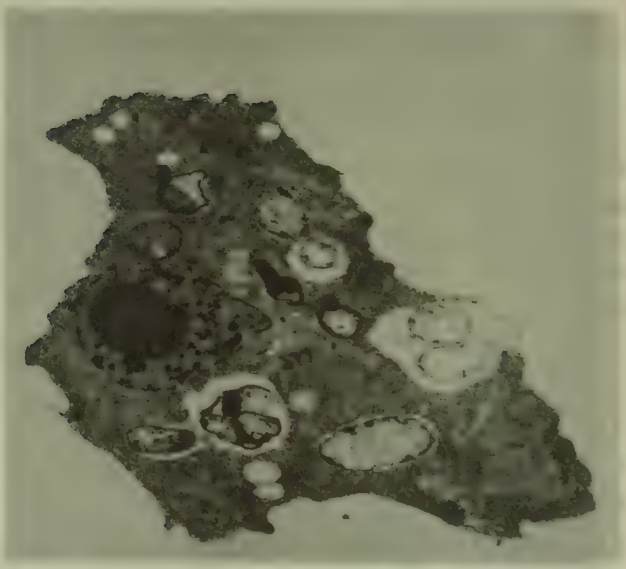
3.4.2.2. Transmissions- und Elektronenmikroskopie

Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Ultradünnschnitte (Abb. 19 - 22 c) zeigen, daß sich die Amöben nach 24 h Mannitinduktion in einem Übergangsstadium zur Zyste befinden (Abb. 22 a). Die Zellen haben sich abgerundet, die Synthese der Zellwand hat bereits begonnen (Abb. 22 c). Wie in echten Zysten (Abb. 21 a) sind zahlreiche Vesikel zu beobachten.



1 µm

Abb. 19:
Amöbe aus einer 5 Tage alten SD-Flüssigkeitskultur mit Pseudopodien und großen Vakuolen



5 /um

Abb. 20:
Eine auf Agar gewachsene Amöbe (6 Tage)

In den Vakuolen sind teilweise schon lysierte E.coli enthalten.

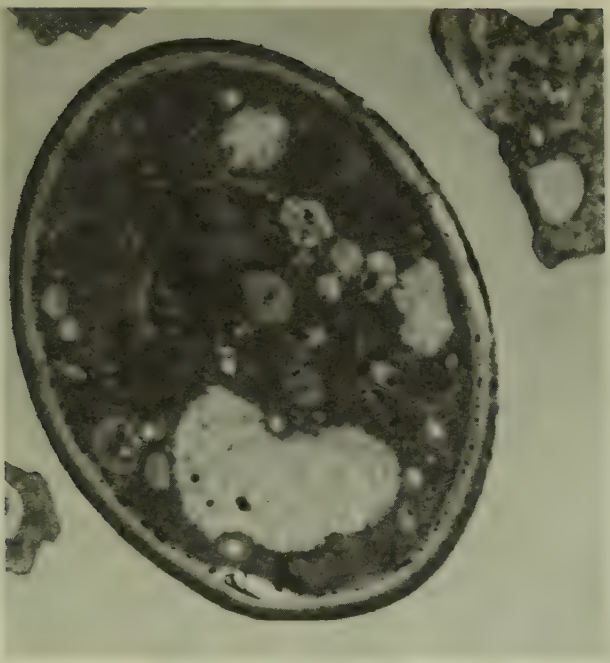
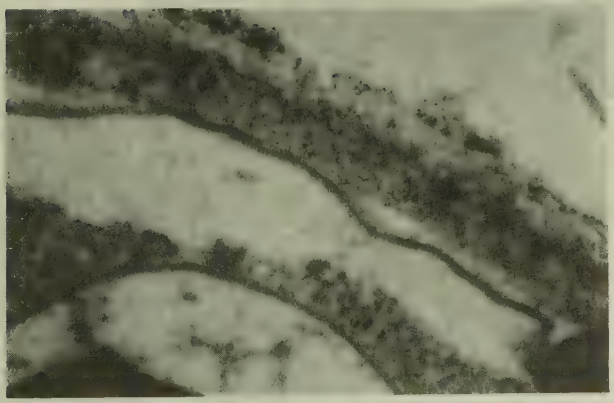


Abb. 21 a:
Zyste mit zweischichtiger Zellwand aus einer 30 Tage alten SD-Kultur

1 /um



0,1 /um

Abb. 21 b:
Ausschnitt aus der Zellwand der gleichen Zyste

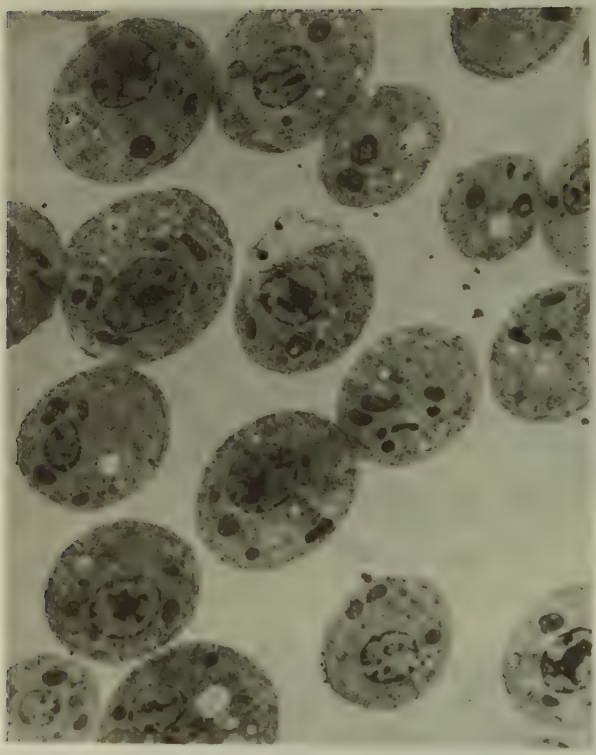


Abb. 22 a:
Junge Zysten nach 24 h Mannit-Induktion (Übersicht)

Abb. 22 b:
Junge Zyste mit zahlreichen Vesikeln nach 24 h Mannitinduktion

1 /um

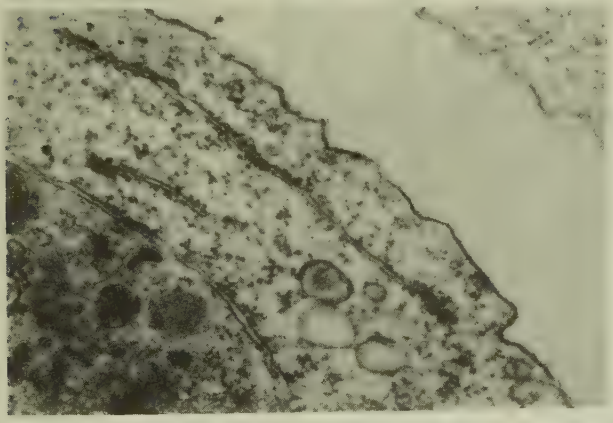


Abb. 22 c:
Ausschnittvergrößerung der gleichen Aufnahme

0,5 /um

3.5. Isoenzymmuster der Aminopeptidasen, RNasen und Proteasen während der Differenzierung

Nachdem durch Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie bewiesen werden konnte, daß ein Übersetzen der wachsenden Kulturen in ein Mannit- bzw. Mannose-Medium eine echte Zysteninduktion bewirkte, wurden nun die Isoenzymmuster der drei Enzyme sowohl im Hunger als auch im künstlichen System untersucht und mit wachsenden Amöben verglichen.
Die Lage der Banden war in allen Fällen unverändert (vgl. Abb. 6 mit 23 a und b, sowie Abb. 3 mit 24).

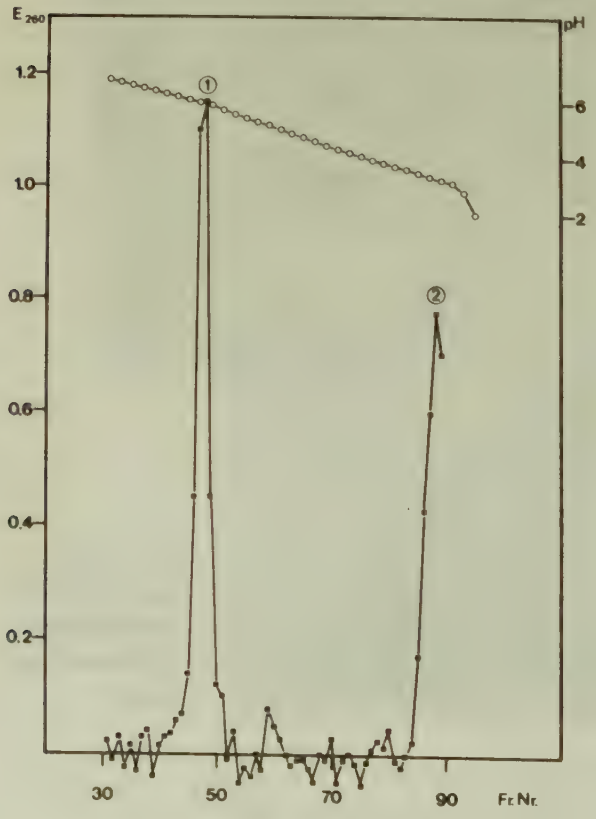


Abb. 23 a: Isoenzymmuster der RNasen nach 24 h Mannose-Induktion

Isoelektrische Punkte:
1 : pH 5.9
2 : pH 3.3

Bei den RNasen zeigten sich leichte Unterschiede in der Aktivität der Bande im sauren pH-Bereich (Abb. 23 a und b).
In hungernden Amöben ist dieses Isoenzym relativ schwach ausgeprägt, während in wachsenden und mannose-induzierten Kulturen annähernd gleich starke Banden zu beobachten waren.

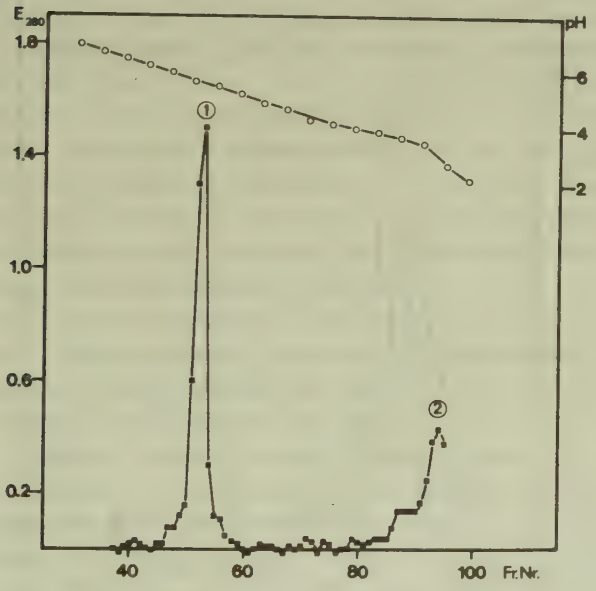


Abb. 23 b:
Isoenzymmuster der RNasen nach 24 h Hunger

Isoelektrische Punkte:
1 : pH 5.6 2 : pH 3.1

Bei Leucinaminopeptidasen war nach 24 h Mannose-Induktion die Aktivität des Isoenzyms 2 geringer als in wachsenden Amöben.

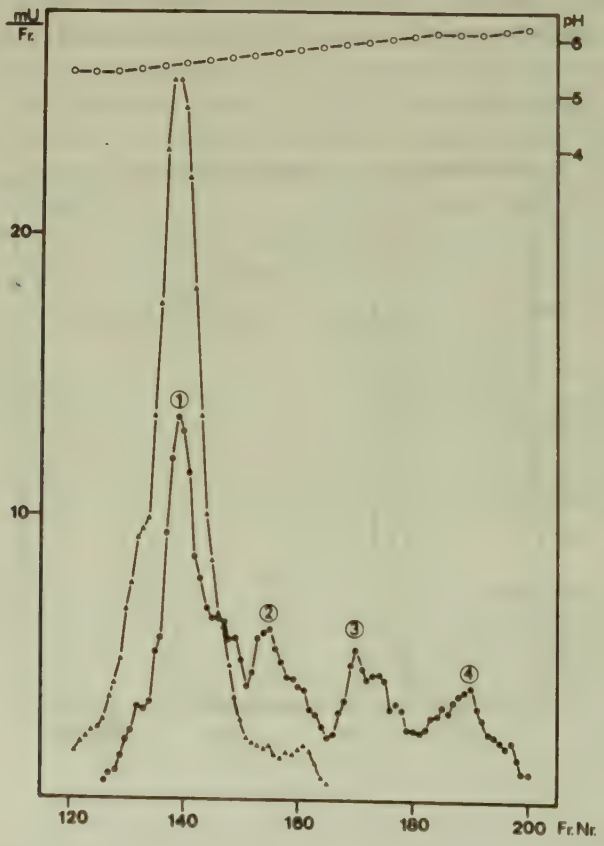


Abb. 24:
Isoenzymmuster der Alanin- und Leucinaminopeptidase nach 24 h Mannose-Induktion

Isoelektrische Punkte:	1 :	pH 5.55	3 :	pH 5.95
	2 :	pH 5.75	4 :	pH 6.10

Das Isoenzymmuster der Proteasen war bei wachsenden, hungernden und mannose-induzierten Kulturen völlig identisch.

4. DISKUSSION

4.1. Zur Zysteninduktion

Nachdem unsere Versuche abgeschlossen waren, erschienen drei Veröffentlichungen über ultrastrukturelle und biochemische Veränderungen während der Zystenbildung von Physarum RSD_8-Amöben (Turner und Johnson, 1975). Diese Untersuchungen wurden mit Flüssigkeitskulturen nach der Vorschrift von Goodman (1972) durchgeführt (GT1-Medium, siehe Tab. 1).
Das in dieser Arbeit verwendete SD-Medium hat demgegenüber den Vorteil, daß seine Zusammensetzung dem halbdefinierten Plasmodienmedium (Daniel und Baldwin, 1964) sehr viel ähnlicher ist, und die so gewonnenen Ergebnisse einen besseren Vergleich der Induktion von Dauerformen der haploiden und diploiden Phase gestatten.
Turner und Johnson verwendeten zur Rasterelektronenmikroskopie eine kompliziertere Fixierung des Amöbenmaterials (Na-Kakodylat, OsO_4), die Bilder der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, daß durch die sehr schnelle und einfache Methode, nämlich Tiefgefrieren in 2-Methylbutan bei -150° C und anschließendes Lyophilisieren ein ebenso gutes reproduzierbares Ergebnis erhalten werden kann.
Außerdem konnten obige Autoren eine vergleichbare Induktion mit 0,5 M Mannit erst nach ca. 14 Tagen erreichen.
In Übereinstimmung mit diesen Veröffentlichungen konnte auch bei RSD_4-Amöben beobachtet werden, daß dieser Differenzierungsprozeß über mehrere Übergangsstufen verläuft, die allerdings wesentlich kürzer waren. Die nach 24 h erhaltenen "Induktionszysten" ähneln sehr jungen,"echten" Zysten stark.
Somit war durch diese beiden Medien (Wachstums- und Induktionsmedium) die Möglichkeit gegeben, Amöben unter fast gleichen physiologischen Versuchsbedingungen wie Plasmodien biochemisch zu untersuchen.

Unter anderen Induktionsbedingungen, z.B. Hunger (Jump, 1954), waren Unterschiede in Haplo- und Diplophase zu beobachten: Während Plasmodien nach Übersetzen in ein nährstoff-freies Salzmedium (Daniel und Baldwin, 1964) nach 24 h zu 90% in ihre Dauerform, die Spherulen, übergegangen waren, fand eine analoge Zystenbildung von Amöben nicht statt.
Auch gegenüber Mannose war ein unterschiedliches Verhalten der beiden Entwicklungsphasen zu beobachten: Bei Amöben ist Mannose ein noch etwas wirksameres Zysteninduktionsmittel als Mannit, während dieser Zucker in seiner Induktionsfähigkeit zur Spherulenbildung nach Mannit und anderen Kohlenhydraten erst an zehnter Stelle steht (Chet und Rusch, 1969).

4.2. Zur Charakterisierung der Aminopeptidasen

Für das Verhalten der intrazellularen Enzyme konnte gezeigt werden, daß das Isoenzymmuster der Alanin- und Leucinaminopeptidasen während der mannitinduzierten Zystenbildung im Gegensatz zur Spherulenbildung von Plasmodien nahezu gleich bleibt, obwohl die Ultrastruktur sich bereits deutlich verändert hat (vgl. Abb. 19 mit 22b).

Die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen einer Reihe weiterer Eigenschaften sind aus Tab. 10 ersichtlich, in der die für Amöben und Plasmodien gefundenen Ergebnisse noch einmal zusammengefaßt und einander gegenübergestellt sind.

Tab. 10: Zusammenfassung der in dieser Arbeit für Amöben und der von Hoffmann (1975) für Plasmodien gefundenen Ergebnisse zur Charakterisierung der Aminopeptidasen

Intrazellulare Leucinaminopeptidasen

Amöben:	Plasmodien:
a. Während des Wachstums	
4 Isoenzyme im pH-Bereich 5 - 6	4 Isoenzyme im pH-Bereich 5.2 - 6.5
Die Substratspezifitäten gegenüber einer Reihe von Nitroaniliden (bezogen auf Leu-NA = 100%) sind sehr ähnlich.	
b. Nach 24 h Hunger	bzw. Mannitinduktion
Keine Umstellung des Isoenzymmusters	Anstieg der spezifischen Aktivität auf das Doppelte, Änderung des Isoenzymmusters verbunden mit einer differentiellen Enzymsynthese

Extrazellulare Leucinaminopeptidasen

a. Während des Wachstums	
Proteinarmes Medium: Anstieg der Aktivität während des Wachstums bis auf 25% der Gesamtaktivität bei gleichem Isoenzymmuster wie in wachsenden Amöben	Spezifische Aktivität: unter 3% der Gesamtaktivität
Proteinreiches Medium: Bei ähnlichem Isoenzymmuster doppelt so hohe spezifische Aktivität	
b. Nach 24 h Hunger	bzw. Mannitinduktion
In beiden Fällen keine Enzymabgabe an die Medien	

Fortsetzung Tab. 10:

Intrazellulare Alaninaminopeptidase

Amöben:	Plasmodien:
a. Während des Wachstums	
1 Isoenzym, p.I. 5.5; spezifische Aktivität im Vergleich zu Leucin-aminopeptidase: etwa gleich hoch	1 Isoenzym, p.I. 5.6; spezifische Aktivität im Vergleich zu Leucin-aminopeptidase: etwa 3x so hoch

b. Nach 24 h Hunger bzw. Mannitinduktion

In beiden Fällen keine Änderung des Isoenzymmusters während der Differenzierung

Extrazellulare Alaninaminopeptidase

a. Während des Wachstums

Proteinarmes Medium: keine Aktivität	Spezifische Aktivität: unter 3% der Gesamtaktivität
Proteinreiches Medium: etwa 50% der extrazellularen Leucinaminopeptidase-Aktivität bei gleichem Isoenzymmuster	

b. Nach 24 h Hunger bzw. Mannitinduktion

In beiden Fällen keine Enzymabgabe an die Medien

Tab. 10 zeigt, daß die primären Unterschiede während der Differenzierung und im Verhalten der extrazellulären Enzyme auftreten. Wachsende Kulturen von Amöben und Plasmodien haben ein ähnliches Isoenzymmuster und eine dadurch bedingte ähnliche Substratspezifität.
Das unterschiedliche Verhalten der extrazellulären Enzyme läßt sich vermutlich nicht durch die Kulturbedingungen erklären, da diese bei Plasmodien und Amöben sehr ähnlich sind.

Bei Amöben ist die Sekretion der Alaninaminopeptidase von der Zusammensetzung des Mediums abhängig: Im proteinarmen Medium kann keine Aktivität festgestellt werden, während im Medium mit hohem Albumingehalt vier Alaninaminopeptidase-Isoenzyme anwesend sind, deren isoelektrische Punkte sich allerdings mit denen der Leucinaminopeptidase-Aktivität decken. Eine solche Induktion von proteinabbauenden Enzymen durch Anwesenheit von Albumin im Medium wurde in mehreren Fällen auch bei anderen Organismen nachgewiesen (e.g. Hanson und Marzluff, 1973, Drucker, 1975).

Auch ließ eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung eines halbdefinierten, albuminhaltigen (3,1%) Mediums von Physarum RSD_4-Amöben auf das Vorhandensein extrazellularer proteolytischer Enzyme schließen (McCullough und Dee, unveröffentlicht).
Weiterhin ergab die Analyse der Aminosäurezusammensetzung dieses Mediums einen erstaunlich hohen Anteil von Phenylalanin (3,2 uM/ml des totalen Aminosäuregehaltes von 7,1 uM/ml). Durch Hochspannungselektrophorese ließ sich zeigen, daß Aminopeptidasen gegenüber ihren natürlichen Substraten, den Dipeptiden, eine ähnlich hohe spezifische Aktivität haben, wie gegenüber den Nitroaniliden. Da gegenüber Phe-NA bei allen drei Leucinaminopeptidase-Isoenzymen eine sehr hohe Spaltungsrate beobachtet werden konnte, ist eine Beteiligung dieses Enzyms am Abbau der Proteinkomponenten des Mediums denkbar.

Die medienbedingten Unterschiede im extrazellularen Aminopeptidase-Isoenzymmuster sind für eine genetische Bearbeitung von großem Vorteil. Das alleinige Vorkommen von Leucinaminopeptidase im SD-Medium ermöglicht ein isoliertes Screening dieses Enzyms, welches intrazellular nicht möglich ist, da sich Leucin- und Alaninaminopeptidase in ihren Substratspezifitäten zum Teil decken (siehe Abb. 3). Im albuminhaltigen Medium läßt sich dagegen Alaninaminopeptidase testen. Das Screening von extrazellularen Enzymen bietet noch einen weiteren Vorteil: Ein Zerstören der Zellen durch Detergentien, das zur Freisetzung der intrazellularen Enzyme erforderlich war, ist hierbei nicht nötig, so daß die Amöben lebend untersucht werden können.

4.3. Zur Charakterisierung der Proteasen

Für Plasmodien wurden von Farr et al. (1974) drei extrazellulare Enzyme gefunden, von denen eines (mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 4.6) rennin-ähnlichen Charakter hat.
Physarum Amöben wiesen ein völlig anderes Isoenzymmuster auf: Von den vier in wachsenden Amöben vorhandenen Isoenzymen, wird nur eines in das proteinarme Medium abgegeben. Keine der Banden ähnelt dem von Farr isolierten und gereinigten rennin-ähnlichen Enzym.
Erstaunlicherweise war in dem proteinreichen Medium keine Proteaseaktivität nachweisbar.

Parallel zu den an Amöben durchgeführten Versuchen, wurden in diesem Labor die plasmodialen Proteasen untersucht (Nuske, unveröffentlicht).
Die vorläufigen Ergebnisse zeigen für intrazellulare Proteasen bei wachsenden Plasmodien neun Isoenzyme, von denen vier in ihren isoelektrischen Punkten mit den vier Isoenzymen bei Amöben übereinstimmen. Zusätzlich treten noch fünf weitere Isoenzyme auf, die in Amöben nicht vorhanden sind, so daß sich folgendes Enzymspektrum ergibt.

Tab. 11: Vergleich der intrazellularen Proteasen in wachsenden Amöben und Plasmodien

p.I.	Amöben	Plasmodien
		(1) 6.4
	(1) 5.5	(2) 5.6
		(3) 5.3
		(4) 4.8
	(2) 4.2	(5) 4.2
	(3) 3.8	(6) 3.8
	(4) 3.6	(7) 3.6
		(8) 3.3
		(9) 3.0

Nach 24 h Hunger ist bei gleichbleibendem Isoenzymspektrum die relative Aktivität des Isoenzyms (5) höher und die des Isoenzyms (6) geringer als in wachsenden Plasmodien, ein geringer Unterschied zu dem Verhalten des Enzymspektrums bei Amöben, das sich während des Hungers nicht ändert.

4.4. Zur Charakterisierung der RNasen

Einen Vergleich, der bisher über RNasen bei Physarum polycephalum veröffentlichten Ergebnisse bietet die Übersicht in Tab. 12.

Tab. 12: Übersicht über die bisher charakterisierten RNasen bei Physarum polycephalum

I. Intrazellulare Enzyme während des Wachstums

Stadium im Generations-zyklus	Isolationsmethode, Anreicherung, Reinigung	Zahl der Isoenzyme	i.P.	MG x 1000	pH-Optimum	Charakterisierung, Substratspezifität, Spaltung von:
RSD_4-Amöben (Ergebnisse dieser Arbeit), Colonia-Amöben (Brand, 1974)	isoelektrische Fokussierung	1.	6.0	?	5.0	ApC, GpU, UpN, poly-A und -U, "core"-RNA
		2.	3.3	?	3.7	ApA, ApC, GpC, GpU, UpN, poly-A u. -U, "core"-RNA unspezifische RNasen
Plasmodien (Brand, 1974)	isoelektrische Fokussierung	1.	3.9	?	3.7	?
		2.	3.7	?	3.7	
		3.	3.4	?	3.7	
Plasmodien (Hiramaru et al., 1969)	DEAE-Cellulose, Gelfiltration (Sephadex G-75)	1. thermo-	?	40	6.7	Guanyloribonuclease
		2. sta-	?	40	4.5	unspezifische RNase
		3. bil	?	10	5.5	unspezifische RNase mit Präferenz für Purin-Nucleotide
		4. thermo-labil	?	?	4.0	Endonuclease mit Präferenz für 3'-terminale Purin-Nucleotide

Fortsetzung Tab. 12:

II. Intrazellulare Enzyme nach 24 h Hunger bzw. Mannit-Induktion

Stadium im Generationszyklus	Isolationsmethode, Anreicherung, Reinigung	Zahl der Isoenzyme	i.P.	MG x 1000	pH-Optimum	Charakterisierung, Substratspezifität, Spaltung von:
RSD_4-Amöben	Isoelektrische Fokussierung	Keine Änderung des Isoenzymmusters und der Substratspezifität				
Plasmodien (Brand, 1974)	Isoelektrische Fokussierung, Affinitätschromatographie	1.	3.5	?	3.7	poly-I und -U, Endonuclease

III. Extrazellulare Enzyme während des Wachstums

RSD_4-Amöben	Isoelektrische Fokussierung	Das Isoenzymmuster gleicht dem intrazellularen. Die spezifische Aktivität ist wesentlich geringer.				
Plasmodien (Brand, 1974)	Isoelektrische Fokussierung	1.	3.7	?	3.7	?
		2.	3.5	?	3.7	
Plasmodien (Braun und Behrens, 1969)	Anreicherung	1.	?	31	4.0	poly-A u. -U, geringe Spalt. v. poly-C, Spalt. aller Dinucleotide außer CpN, Endonuclease
Plasmodien (Farr et al., 1972)	Reinigung (DEAE-Cellulose)	1. thermolabil	?	?	4.5 - 5	
		2.	?	?	?	

Darüber hinaus werden zur Zeit von Prof. Hüttermann ausgedehnte Untersuchungen über die Substratspezifität der intrazellularen Isoenzyme an Plasmodien durchgeführt. Durch Änderung der Versuchsbedingungen bei der isoelektrischen Fokussierung der RNasen konnte die am weitesten im sauren Bereich liegende Bande inzwischen in weitere Isoenzyme zerlegt werden, so daß sich jetzt insgesamt fünf Banden für RNase ergeben, deren Substratspezifität mit der von Amöben verglichen werden kann (Tab. 13).

Tab. 13: Die Substratspezifität der RNase-Isoenzyme in der Haplo- und Diplophase
+ : Spaltung - : keine Spaltung

Nucleotide	Isoelektrische Punkte der Banden						
	Amöben		Plasmodien				
	3.1	6.0	3.0	3.2	3.4	3.7	3.9
ApA	+	-	-	-	-	+	+
ApC	+	+	-	-	-	+	+
ApU	-	-	-	+	+	-	-
CpC	-	-	-	-	-	-	-
CpG	-	-	-	-	-	-	-
GpC	+	-	O	+	+	+	O
GpU	+	+	+	+	+	+	+
UpA	+	+	+	+	+	+	+
UpC	+	+	-	-	-	+	+
UpG	+	+	+	+	+	+	+
UpU	+	+	-	-	-	-	-
Poly-A	-	+	-	-	-	-	-
Poly-C	-	-	-	-	-	-	-
Poly-G	-	-	-	-	-	-	-
Poly-U	+	+	+	+	+	+	+

Aus den Tab. 12 und 13 läßt sich folgendes ablesen:

I. Bei der Charakterisierung der Isoenzyme und ihrer Substratspezifität in wachsenden Kulturen sind deutliche Unterschiede zu bemerken. Die in den Amöben gefundenen Banden stimmen mit den plasmodialen nie in allen untersuchten Kriterien überein. Das Isoenzym bei p.I. 6.0 unterscheidet sich von allen plasmodialen Isoenzymen durch seine Aktivität gegenüber poly-A und durch sein pH-Optimum. Beide Isoenzyme spalten im Gegensatz zu den plasmodialen UpU.
Ein isoliertes Screening der beiden Isoenzyme in Amöben ist auf Grund ihrer unterschiedlichen Substratspezifität in Bezug auf ApA, GpC und poly-A möglich.

II. Auch während der Differenzierung verhalten sich die Amöben anders als Plasmodien. Im Gegensatz zur Sklerotienbildung findet während der Enzystierung keine Umstellung des Isoenzymmusters statt.

III. Die Unterschiede in der spezifischen Aktivität der extrazellularen RNasen sind ebenfalls von Bedeutung. Plasmodien haben ein extrazellulares Isoenzymmuster, das sich deutlich in den isoelektrischen Punkten und der Substratspezifität von dem intrazellularen unterscheidet. Aus diesem Grund wurde von Farr et al. (1972) vermutet, daß es sich um zwei verschiedene Enzyme handelt. Bei Amöben jedoch wurde intra- und extrazellular ein identisches Isoenzymmuster gefunden, ein Hinweis, daß es sich hier um die gleichen Enzyme handeln könnte.

4.5. Vergleich des haploiden und diploiden Entwicklungsstadiums im Hinblick auf eine mögliche differentielle Genaktivität

Von einigen Autoren wurden kürzlich Untersuchungsergebnisse am apogamen bzw. homothallischen Physarum-Stamm "Colonia" vorgelegt, die eine Aktivität von unterschiedlichen Gensätzen während der verschiedenen Phasen des Entwicklungszyklus vermuten ließen.

Bei der Untersuchung von temperatur-sensitiven Mutanten in diesem isogenischen Stamm wurde die erstaunliche Beobachtung gemacht, daß Mutationen, die in Amöben isoliert werden konnten, nicht im Plasmodium exprimiert waren (Grant und Wheals, 1974, unveröffentlicht). Umgekehrt traten bei Plasmodien temperatursensitive Mutationen auf, die nicht in Amöben ausgedrückt waren (Dove, 1976, persönl. Mitteilung). Allerdings liegen für diese Mutanten überhaupt noch keine biochemischen Daten vor, die diese Beobachtungen erklären könnten.

Biochemische Untersuchungen, die von Brand et al. (1975) für RNasen an Amöben und Plasmodien dieses Stammes durchgeführt wurden, ergaben folgendes: Es wurde - genau wie im heterothallischen "Wisconsin"-Stamm - ein unterschiedliches Isoenzymmuster für die Haplo- und Diplophase gefunden. Da beide Stadien das gleiche Genom besitzen, wurden diese Veränderungen des Isoenzymmusters auf eine vermutliche differentielle Genaktivität in beiden Entwicklungsstadien zurückgeführt.
LeStourgeon et al. (1973) fanden bei vergleichenden Untersuchungen der sauren Kernproteine im haploiden und diploiden Stadium von Physarum ("Wisconsin"-Stamm) signifikante Unterschiede. Einige dieser Proteine waren spezifisch für Amöben.

Die in den beiden Veröffentlichungen beschriebenen Untersuchungen hatten jedoch den Nachteil, daß Amöben und Plasmo-

dien nicht unter vergleichbaren physiologischen Bedingungen gezüchtet worden waren. Die Amöben stammten aus Agarkulturen, bzw. aus dem sehr komplexen Flüssigkeitsmedium nach Goodman (1972), während die Plasmodien im halbdefinierten Medium nach Daniel und Baldwin (1964) gezogen worden waren.

In dieser Arbeit wurden dagegen erstmals Untersuchungen an Amöben durchgeführt, die unter fast identischen physiologischen Bedingungen wie Plasmodien kultiviert worden waren. Die vorgelegten Ergebnisse sind ein sehr deutlicher Hinweis für eine differentielle Genaktivität in den beiden vegetativen Stadien des Generationszyklus von Physarum polycephalum.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1.) Die Isolation von Enzymmangelmutanten durch eine Anreicherung mit der BUdR-Suicide-Technik und anschließende Selektion mit klassischen Methoden war bei Physarum RSD_4-Amöben nicht möglich.

2.) In wachsenden Plasmodien und Amöben von Physarum polycephalum ist das Isoenzymmuster der Aminopeptidasen und damit verbunden auch die relative Aktivität gegenüber einer Reihe von Nitroaniliden sehr ähnlich.
Im schwach sauren Bereich wurden eine Alanin- und vier Leucinaminopeptidase-Isoenzyme gefunden. Während des Wachstums geben die Amöben (im Gegensatz zu Plasmodien) Leucinaminopeptidase an ein proteinarmes Medium ab. In einem proteinreichen Medium wurde außerdem noch Alaninaminopeptidaseaktivität nachgewiesen. Das Verhalten der Amöben gegenüber diesen beiden Medien ermöglicht ein isoliertes Screening von Leucin- und Alaninaminopeptidase in lebenden Amöben.

3.) Es existieren zwei RNase-Isoenzyme mit isoelektrischen Punkten bei pH 3.3 und 5.9. Die beiden Banden unterscheiden sich voneinander sowohl in ihren pH-Optima (pH 3.7 bzw. 5.0) als auch in ihrer Aktivität gegenüber den Nucleotiden ApA, GpC und poly-A. Somit ist auch hier ein isoliertes Screening der "sauren" und "neutralen" Bande möglich.
Das von den plasmodialen RNasen abweichende Isoenzymmuster bedingt eine unterschiedliche Substratspezifität der Banden in beiden Stadien.

4.) Vier von den zehn in Plasmodien vorhandenen Protease-Isoenzymen waren auch in Amöben aufzufinden. Im proteinarmen Medium war von diesen - im schwach sauren Bereich liegenden Banden - nur noch eine zu identifizieren. Im proteinreichen Medium konnte keine Proteaseaktivität festgestellt werden.

5.) Es wurde durch drei Methoden (Licht-, Rasterelektronen- und Transmissionselektronenmikroskopie) gezeigt, daß eine Induktion der Zystenbildung nach 24stündiger Maniteinwirkung erfolgt und dabei typische Zysten gebildet werden. Eine ebenso schnelle Induktion konnte mit dem entsprechenden Zucker (Mannose) erreicht werden. Dieser Prozeß fand auch in Anwesenheit von Cycloheximid und Actinomycin statt.
Im Gegensatz zur Sklerotienbildung konnte eine Enzystierung von Amöben durch Hunger nicht induziert werden.

6.) Eine Untersuchung der drei Enzyme nach 24stündiger Mannoseinduktion zeigte nur geringfügige Abweichungen in der relativen Aktivität der Banden. In keinem Fall wurde eine Veränderung des Isoenzymspektrums beobachtet, obwohl die Struktur und Ultrastruktur bereits deutlich verändert war.
Bei Plasmodien ist dagegen die analoge Sklerotienbildung von zum Teil weitgehenden Umstellungen im Isoenzymmuster der drei Enzyme begleitet.
Diese beträchtlichen Unterschiede im Verhalten von drei Enzymen aus verschiedenen Stoffwechselbereichen in axenisch wachsenden Amöben und Plasmodien sind ein deutlicher Hinweis für eine differentielle Genaktivität in den beiden vegetativen Stadien von Physarum polycephalum.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adler, P.N.
Holt, C.E.
1974 Change in properties of Physarum polycephalum amoebae during extended culture.
J. Bact. 120, 532 - 533

Brand, G.
Hüttermann, A.
Haugli, F.B.
1975 Differential expression of RNase activities in the life cycle of Physarum polycephalum.
Naturwissenschaften 11, 535 - 536

Brand, G.
1974 Entwicklungsgenetische Untersuchungen an Physarum polycephalum: Differenzierungsbedingte Aktivitätsänderung und Isoenzym-Muster der Ribonucleasen.
Dissertation, Universität Tübingen

Braun, R.
Behrens, K.
1969 A ribonuclease from Physarum.Biochemical properties and synthesis in the mitotic cycle.
Biochim. Biophys. Acta 195, 87 - 98

Brenner, M.
Tisdale, D.
Loomis, W.F. jun.
1975 Techniques for rapid biochemical screening of large numbers of cell clones.
Exptl. Cell Res. 90, 249 - 252

Carlile, M.J.
1973 Cell fusion and somatic incompatibility in myxomyxetes.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 123 - 139

Chet, I.
Rusch, H.P.
1969 Induction of spherule formation in Physarum polycephalum by polyols.
J. Bact. 100, 673 - 678

Dee, J.
1973 Aims and techniques of genetic analysis in Physarum polycephalum.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 93 - 121

Dee, J.
1975 Slime moulds in biological research.
Sci. Prog., Oxf. 62, 523 - 542

Daniel, J.W.
Baldwin, H.H.
1964 Methods of culture for plasmodial myxomycetes.
In: E.M. Prescott (ed.), Methods in Cell Physiology I, 9 - 41.
Academic Press, New York and London

Drucker, H.
1975 Regulation of exocellular proteases in Neurospora crassa: metabolic requirements of the process.
J. Bact. 122, 1117 - 1125

Erlanger, B.F. 1961 The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin.
Kokowsky, N.
Cohen, W.
Arch. Biochem. Biophys. 95, 271 - 278

Farr, D.R. 1972 Isolation and purification of the extracellular ribonuclease from Physarum polycephalum.
Amster, H.
Horisberger, M.
Arch. Microbiol. 85, 249 - 252

Farr, D.R. 1974 An extracellular rennin-like enzyme produced by Physarum polycephalum.
Horisberger, M.
Jollès, P.
Biochim. Biophys. Acta 334, 410 - 416

George, R.P. 1972 Scanning electron microscopy of spore germination in Dictyostelium discoideum.
Albrecht, R.M.
Raper, K.B.
Sachs, I.B.
McKenzie, A.P.
J. Bact. 112, 1383 - 1386

Gesteland, R.F. 1966 Isolation and characterization of ribonuclease I mutants of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 16, 67 - 84

Goodman, E.M. 1972 Axenic culture of myxamoebae of the myxomycete Physarum polycephalum.
J. Bact. 111, 242 - 247

Goodman, E.M. 1970 Ultrastructural changes during spherule formation in Physarum polycephalum.
Rusch, H.P.
J. Ultrastruct. Res. 30, 172 - 183

Goodman, E.M. 1969 Polyphosphate and other phosphorus compounds during growth and differentiation of Physarum polycephalum.
Sauer, H.W.
Sauer, L.
Rusch, H.P.
Can. J. Microbiol. 15, 1325 - 1331

Gray, W.D. 1968 Biology of the myxomycetes.
Alexopoulos, C.J.
The Ronald Press Co., New York

Guttes, E. 1964 Mitotic synchrony in the plasmodia of Physarum polycephalum and mitotic synchronization by coalescence of microplasmodia.
Guttes, S.
In: E.M. Prescott (ed.), Methods in Cell Physiology I, 43 - 54.
Academic Press, New York and London

Haglund, H. 1967 Isoelectric focusing in natural pH-gradients - A technique of growing importance for fractionation and characterization of proteins. Sci. Tools 14, 17 - 23

Halvorson, H.O. Ellias, L. 1958 The purification of an α-glucosidase of Saccharomyces italicus Y-1225. Biochim. Biophys. Acta 30, 28 - 40

Hanson, M.A. Marzluf, G.A. 1973 Regulation of a sulfur-controlled protease in Neurospora crassa. J. Bact. 116, 785 - 789

Haugli, F.B. 1971 Mutagenesis, selection and genetic analysis in Physarum polycephalum. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin

Haugli, F.B. Dove, W.F. 1972 Mutagenesis and mutant selection in Physarum polycephalum. Molec. gen. Genet. 118, 109 - 124

Henney, H.R. jun. Henney, M.R. 1968 Nutritional requirements for the growth in pure culture of the myxomycete Physarum polycephalum and related species. J. gen. Microbiol. 53, 333 - 339

Hilmoe, R.J. 1960 Purification and properties of spleen phosphodiesterase. J. Biol. Chem. 235, 2117 - 2121

Hiramaru, M. Uchida, T. Egami, F. 1969 Studies on ribonucleases from Physarum polycephalum. Purification and characterization of substrate specifity. J. Biochem. 65, 693 - 708

Hoffmann, W. 1975 Entwicklungsgenetische Untersuchungen an Physarum polycephalum: Aktivität, Isoenzymmuster und differentielle Synthese von Aminopeptidasen während der Sklerotienbildung. Dissertation, Universität Tübingen

Hoffmann, W. Hüttermann, A. 1975 Aminopeptidases of Physarum polycephalum. Activity, isoenzyme pattern, and synthesis during differentiation. J. Biol. Chem. 250, 7420 - 7427

Hüttermann, A. 1972 Isoenzyme pattern and d e n o v o synthesis of phosphodiesterase during differentiation (spherulation) in Physarum polycephalum.
Arch. Microbiol. 83, 155 - 164

Hüttermann, A. 1973 Biochemical events during spherule formation of Physarum polycephalum.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 55 - 76

Hüttermann, A. 1973 Physarum polycephalum Studienobjekt der Zellbiologie.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 165 - 179

Hüttermann, A.
Elsevier, S.M.
Eschrich, W. 1971 Evidence for the d e n o v o synthesis of glutamate dehydrogenase during spherulation of Physarum polycephalum.
Arch. Microbiol. 77, 74 - 85

Jockusch, B.M. 1975 Neuere Forschungen über Zellzyklus und Kernteilung am Schleimpilz Physarum polycephalum.
Naturwissenschaften 62, 283 - 289

Jump, J.A. 1954 Studies on sclerotization in Physarum polycephalum.
Amer. J. Bot. 41, 561 - 567

Kint, J.A. 1975 A simple microtechnique for isoelectric focusing on a density gradient.
Anal. Biochem. 67, 679 - 683

Kleinig, H. 1974 Differentiation of Physarum polycephalum: inhibition by alcohols.
Cytobiol. 9, 240 - 243

Koerner, J.F.
Sinsheimer, R.L. 1957 A deoxyribonuclease from calf spleen. II. Mode of action.
J. Biol. Chem. 228, 1049 - 1061

Krishna Murti, C.R. 1971 Encystment of amoebae: an example of single cell differentiation.
Curr. Sci. 22, 589 - 593

LeStourgeon, W.M.
Goodman, E.M.
Rusch, H.P. 1973 The nuclear acidic proteins from haploid and diploid cell states of Physarum polycephalum.
Biochim. Biophys. Acta 317, 524 - 528

Luft, J.H. 1961 Improvements in epoxy resin embedding methods.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409 - 414

McCormick, J.J. Blomquist, J.C. Rusch, H.P. 1970a Isolation and characterization of an extracellular polysaccharide from Physarum polycephalum.
J. Bact. 104, 1110 - 1118

McCormick, J.J. Blomquist, J.C. Rusch, H.P. 1970b Isolation and characterization of a galactosamine wall from spores and spherules of Physarum polycephalum.
J. Bact. 104, 1119 - 1125

Messer, W. Vielmetter, W. 1965 High resolution colony staining for the detection of bacterial growth requirement mutants using naphthol azo-dye techniques.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 182 - 186

Mohberg, J. Rusch, H.P. 1971 Isolation and DNA content of nuclei of Physarum polycephalum.
Exp. Cell. Res. 66, 305 - 316

Nachlas, M.M. Crawford, D.T. Seligman, A.M. 1957 The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase.
J. Histochem. Cytochem. 5, 264 - 278

Ortiz, J.M. 1974 Mutant of Bacillus subtilis lacking exo-ß-N-acetylglucosaminidase activity.
J. Bact. 117, 909 - 910

Pollack, R.M. Dumsha, T.C. 1974 On the use of p-nitroanilides as substrates for proteolytic enzymes.
FEBS Letters 38, 292 - 294

Rakoczy, L. 1973 The mycomycete Physarum nudum as a model organism for photobiological studies.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 141 - 164

Sauer, H.W. Babcock, K.L. Rusch, H.P. 1970 Changes in nucleic acid and protein synthesis during starvation and spherule formation in Physarum polycephalum.
Wilh. Roux' Arch. 165, 110 - 124

Schiebel, W. 1973 The cell cycle of Physarum polycephalum.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 11 - 38

Toama, M.A.
Raper, K.B. 1967 Microcysts of the cellular slime mold Polysphondylium pallidum.
I. Factors influencing microcyst formation.
J. Bact. 94, 1143 - 1149

Toama, M.A.
Raper, K.B. 1967 Microcysts of the cellular slime mold Polysphondylium pallidum.
II. Chemistry of the microcyst walls.
J. Bact. 94, 1150 - 1153

Tomarelli, R.M
Charney, J.
Harding, M.L. 1949 The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity.
J. Lab. Clin. Med. 34, 428 - 433

Tuppy, H.
Wiesbauer, U.
Wintersberger, E. 1962 Aminosäure-p-nitroanilide als Substrate für Aminopeptidasen und andere proteolytische Fermente.
Z. Physiol. Chem. 329, 278 - 288

Turner, H.M.
Johnson, J. 1975a Transmission and scanning electron microscopy of changes associated with microcyst formation in the myxamoebae of Physarum polycephalum.
Cytobios 12, 95 - 107

Turner, H.M.
Johnson, J. 1975b A biochemical analysis of induction of microcyst formation in Physarum polycephalum myxamoebae by mannitol.
Cytobios 13, 229 - 239

Turner, H.M.
Johnson, J. 1975c Ultrastructural changes associated with induction of microcyst formation by mannitol in Physarum polycephalum amoebae.
Cytobios 13, 241 - 250

Tuve, T.W.
Anfinsen, C. B. 1960 Preparation and properties of spinach ribonuclease.
J. Biol. Chem. 235, 3437 - 3441

Wachsmuth, E.D. Fritze, I. Pfleiderer, G. 1966 An aminopeptidase occuring in pig kidney. I. An improved method of preparation. Physical and enzymic properties. Biochemistry 5, 169 - 174

Wachsmuth, E.D. Fritze, I. Pfleiderer, G. 1966 An aminopeptidase occuring in pig kidney. II. A study on the mechanism of the hydrolysis. Biochemistry 5, 175 - 182

Wheals, A.E. 1970 A homothallic strain of the myxomycete Physarum polycephalum. Genetics 66, 623 - 633

LEBENSLAUF

Am 22.7.1948 wurde ich als Tochter des Apothekers Hans-Jürgen Haars und seiner Ehefrau Marta Haars, geb. Dorsel, in Goslar geboren.
Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich das neusprachliche Gymnasium in Goslar, das ich im Juni 1967 nach bestandenem Abitur verließ.
Zum Sommersemester 1970, nach zweijähriger Praktikantenzeit und abschließendem pharmazeutischen Vorexamen in Hannover, begann ich das Pharmaziestudium an der Universität Kiel, das ich im Juni 1973 mit dem Staatsexamen abschloß.
Seit April 1974 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation im Forstbotanischen Institut der Universität Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. A. Hüttermann.